



**INSTITUTO DE ACUICULTURA
UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**

**Desarrollo del cultivo integral de la coquina
Donax trunculus (Linnaeus, 1758). Ciclo
reproductivo, cultivo en criadero y en el
medio natural**

Memoria presentada por:

Andrea Louzán Pérez

Para optar al grado de Doctora en Biología

2015



Dorotea Martínez Patiño, Susana Nóvoa Vázquez, Doctoras en Biología e Investigadoras del Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo-CIMA (Xunta de Galicia), **Fiz da Costa González**, Doctor en Biología, Ingeniero en Investigación y Desarrollo en Novostrea Bretagne, **José Luís Sánchez López**, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Instituto de Acuicultura (Universidad de Santiago de Compostela).

INFORMAN:

Que el trabajo titulado “Desarrollo del cultivo integral de la coquina *Donax trunculus* (Linnaeus, 1758). Ciclo reproductivo, cultivo en criadero y en el medio natural” presentado por Andrea Louzán Pérez para optar al Título de Doctora en Biología, ha sido realizado bajo su dirección coordinada. Considerándolo finalizado, autorizan su presentación y defensa.

Ribadeo, 14 de julio de 2015



Fdo. **Dra. Dorotea Martínez Patiño**

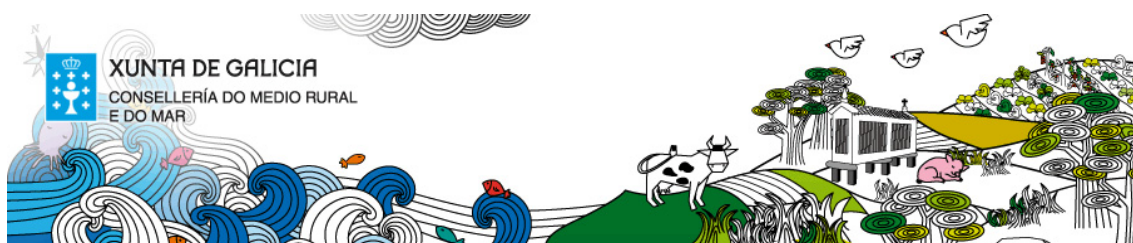
Fdo. **Dra. Susana Nóvoa Vázquez**

Fdo. **Dr. Fiz da Costa González**

Fdo. **Dr. José Luís Sánchez López**



Esta tesis ha sido desarrollada en el Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo (CIMA), perteneciente a la Consellería do Medio Rural e do Mar, mediante una beca de formación de personal especialista en temas de investigación marina otorgada por Resolución de la Dirección General de Innovación y Desarrollo Pesquero del 31 de octubre de 2006 (DOG nº 230 del 29 de noviembre de 2006) con posterior contrato en prácticas en el mismo Centro hasta el año 2010.



Las experiencias que integran el presente estudio se realizaron en el marco de los siguientes proyectos de investigación:

“Cultivo de nuevas especies de moluscos bivalvos de interés en hatcheries”. Plan Nacional de Cultivos Marinos (JACUMAR). Duración del proyecto: 2006 – 2009.

“Optimización del cultivo intensivo de almeja e identificación de marcadores genéticos para el seguimiento de las repoblaciones”. Plan Nacional de Cultivos Marinos (JACUMAR). Año 2010.

“Cultivo en criadero, preengorde en batea y análisis de la diversidad genética de la coquina *Donax trunculus* en Galicia”. I+D Gallego. Duración del proyecto: 2011 – 2012.





A mi querida familia y en especial a mi padre



AGRADECIMIENTOS

El fin de un trabajo siempre requiere una mirada atrás en el tiempo. Mirada que en mi caso provoca una sonrisa y da paso al agradecimiento. Directores, compañeros, colegas de profesión, familia y amigos, todos habéis participado y hecho esto posible.

Quisiera comenzar hablando del Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo de donde nace este proyecto y gracias a quien culmina. Resulta fácil sacar un proyecto adelante cuando tu entorno laboral es como una familia. En primer lugar, quiero dar las gracias a mis tres directores de tesis. A Tea y Susana por haberme escogido y concederme la gran oportunidad de formar parte de vuestro equipo. Gracias por tantas enseñanzas, paciencia, consejos y todos los buenísimos momentos que he pasado a vuestro lado. A Fiz por ser tan buena persona como profesional, a su constante ánimo y ayuda desinteresada. A los tres, un enorme GRACIAS por todo el tiempo y trabajo que habéis invertido en esta tesis y en especial, por este grandísimo esfuerzo final que habéis hecho. De los tres, no solo he ganado conocimiento, sino valores y vivencias que siempre me acompañarán y me harán recordaros con gran cariño.

Sigo con el resto de compañeros, Justa, siempre dispuesta a ayudar y dar un punto positivo a todo. Menel, gracias por compartir tu extensa experiencia no solo en el ámbito de la acuicultura. Gracias a Ana Cruzado y Conchita por gestiones de todo tipo y a ti en especial Conchi por todas las correcciones de tantos trabajos, de esta tesis y en especial de la durísima parte de la bibliografía. Siempre una sonrisa al recordaros, no solo por vuestra intervención en el ámbito profesional, sino por tantas vivencias divertidas fuera del trabajo. Gracias a Merchi por ser tan cariñosa y por su esmero cuidando el fitoplancton. A Javi por hacerme reír siempre y echar una mano en lo posible. A Maria José por las tareas de criadero y cuidado de progenitores. A Mercedes por los desayunos, faxes, gestiones. A José María que vive en nuestros corazones y cuya esencia allí permanece.

Gracias a todos los becarios y técnicos que han compartido tiempo con nosotros: Mari, Sari, Diana, Iria, Belén, Alex, Pol, Rocío..., como no a Escudero por sus contribuciones técnicas y mantenimiento. A Alicia por tantos días de trabajo y

muestreos, para mí, fundamental ayuda sin la cual muchas experiencias de la cocina no hubiesen salido adelante. A Ana, Curro, Vicky y Jana importantísimos compañeros y amigos. Ha sido un orgullo trabajar con vosotros pero sobre todo haber ganado vuestra amistad.

Sin duda, familia de Ribadeo, he pasado con vosotros de los mejores años de mi vida. Nunca tendré palabras para agradecerlos el haberme querido y cuidado tanto.

También han colaborado en este trabajo las cofradías de Ribadeo, Cedeira, O Vicedo y O Barqueiro. Gracias a sus asistencias técnicas: Natalia, compañera y amiga desde mi llegada a Ribadeo, a Alba de Cedeira, Aitor de O Vicedo y Pisco de O Barqueiro. Agradezco vuestra desinteresada ayuda en tareas de todo tipo y sobre todo en los duros muestreos. Mencionar también a Miriam y Vicente del minicriadero de O Vicedo. Susi Carballal y demás personal investigador del CIMA de Corón. A los biólogos de la Delegación de Celeiro donde también se encuentra Laura a la que recuerdo con gran afecto y que tanta ayuda me ha prestado. Al departamento de microbiología de la USC, en especial a Susana Prado y Juan Barja. A Inés, Suso y personal del CACTI de Vigo. A Oscar Moreno, Domitilia Matias y personal de los centros de investigación de Huelva y Tavira por haberme acogido y formado en mis estadias.

Una especial mención a Josefina Méndez, Ana Insua, Ana Nantón y al equipo de Xenomar de la Facultad de Ciencias de A Coruña. A Antonio Cerviño del CIMA. También a Maria Fariña, Cristina Vidal y personal de Ameixa de Carril S.L., por su colaboración en este último proyecto.

Si olvido mencionar a alguien, espero me disculpe, habrá sido sin duda motivo de despiste y de ganas de por fin terminar.

Finalizados los agradecimientos profesionales, los agradecimientos más cariñosos a todos mis amigos y familia. Pediros disculpas por tanta ausencia o tiempo que no pasé a vuestro lado por estar escribiendo este manuscrito. La tesis de la que tanto os hablaba, por fin terminó.

Gracias a mis amigos de Sanxenxo: Irene, Rocío, Cacho, a mi Rosiña de Ribadeo, a mis amigos de la Facultad de Santiago y A Coruña. A mis buzos de la escuela de Buceo de San Amaro, a Mani, Gemma y a mis actuales compañeras de trabajo siempre pendientes de mí.

Gracias a Pepe por tantos años de apoyo con *Donax trunculus* del cual ya eres todo un experto. A mis abuelos, tíos y primos. A Julián, por quererme, hacerme sentir tan especial y animarme a dar el paso de ser doctora.

A mi hermano, a Marta y a mi sobrinita Emma. A mis padres porque les debo todo. Y en especial a ti papá. Sé que me proteges desde donde estás, era una de tus ilusiones así que esta tesis está dedicada íntegramente a ti.





ÍNDICE





ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	3
1.1. CLASIFICACIÓN, HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN	3
1.2. MORFOLOGÍA Y FISIOLÓGÍA	5
1.2.1. Aparato circulatorio	7
1.2.2. Aparato respiratorio	7
1.2.3. Aparato digestivo	7
1.2.4. Aparato excretor	8
1.2.5. Sistema nervioso	8
1.2.6. Aparato reproductor	8
1.3. CICLO VITAL	10
1.4. PLANES DE EXPLOTACIÓN	11
1.5. PRODUCCIÓN DE <i>DONAX TRUNCULUS</i> . SITUACIÓN ACTUAL DE LOS BANCOS DE COQUINA EN GALICIA	14
1.6. POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO	19
2. OBJETIVOS	25
3. CAPÍTULO I. CICLO GAMETOGENICO	29
3.1. INTRODUCCIÓN	29
3.2. MATERIAL Y MÉTODOS	35
3.2.1. Recogida y procesado	35
3.2.2. Índice de condición	36
3.2.3. Histología	36
3.2.4. Bioquímica	39
3.2.5. Determinación de cenizas	44
3.3. RESULTADOS	45
3.3.1. Ciclo gametogénico de la coquina	45
3.3.1.1. Variación de los estadios del ciclo gametogénico	55
3.3.2. Datos biométricos, pesos secos e índice de condición	57
3.3.3. Bioquímica asociada al ciclo reproductivo	59
3.3.3.1. Composición en carbohidratos	59
3.3.3.2. Composición en lípidos	60
3.3.3.3. Composición en proteínas	61
3.3.4. Contenido en cenizas	62
3.3.5. Evolución de la composición bioquímica en relación con el ciclo gametogénico	63
3.4. DISCUSIÓN	65

4. CAPÍTULO II. DESARROLLO EMBRIONARIO Y LARVARIO	71
4.1. INTRODUCCIÓN	71
4.2. MATERIAL Y MÉTODOS	74
4.2.1. Obtención de gametos y larvas	74
4.2.2. Visualización al microscopio óptico	74
4.2.3. Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido	75
4.2.4. Preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión	77
4.3. RESULTADOS	79
4.4. DISCUSIÓN	107
5. CAPÍTULO III. CULTIVO EN CRIADERO Y EN EL MEDIO NATURAL	113
5.1. INTRODUCCIÓN	113
5.2. MATERIAL Y MÉTODOS	125
5.2.1. Cultivo en criadero	125
5.2.1.1. Cultivo de fitoplancton	125
5.2.1.2. Recogida de los reproductores	129
5.2.1.3. Estabulación de los progenitores	130
5.2.1.4. Acondicionamiento de progenitores	131
5.2.1.5. Inducción a la puesta	132
5.2.1.6. Recogida de desoves y fecundación	133
5.2.1.7. Cultivo larvario	133
5.2.1.8. Cultivo postlarvario y de semilla	136
5.2.2. Cultivo en el medio natural	137
5.2.2.1. Preengorde de semilla	137
5.2.3. Toma de medidas y tratamiento de datos	145
5.2.3.1. Recogida de desoves. Número de ovocitos por hembra	145
5.2.3.2. Cultivo larvario. Crecimiento y supervivencia	146
5.2.3.3. Cultivo postlarvario y de semilla. Crecimiento y supervivencia	146
5.2.3.4. Cultivo en el medio natural. Crecimiento y supervivencia	147
5.2.3.4.1. Preengorde de semilla	147
5.2.3.4.2. Siembra directa de semilla en el sustrato	147
5.3. RESULTADOS	149
5.3.1. Cultivo en criadero	149
5.3.1.1. Acondicionamiento de progenitores	149
5.3.1.2. Inducción a la puesta y recogida de desoves	151
5.3.1.3. Cultivo larvario	153
5.3.1.4. Cultivo postlarvario y de semilla	157
5.3.2. Cultivo en el medio natural	158
5.3.2.1. Preengorde de semilla	158
5.3.2.1.1. Experiencia 1	158
5.3.2.1.2. Experiencia 2	160
5.3.2.1.3. Experiencia 3	162
5.3.2.1.4. Experiencia 4	164

5.3.2.1.5. Experiencia 5	165
5.3.2.1.6. Siembra directa de semilla en el banco natural de origen de los reproductores	167
5.4. DISCUSIÓN	170
6. CAPÍTULO IV. BIOQUÍMICA DE LOS DESARROLLOS LARVARIOS ---	181
6.1. INTRODUCCIÓN	181
6.2. MATERIAL Y MÉTODOS	186
6.2.1. Seguimiento de la evolución bioquímica de los desarrollos larvarios.....	186
6.2.2. Prueba de alimentación	187
6.2.3. Prueba de ayuno	189
6.2.4. Métodos bioquímicos.....	189
6.2.5. Cálculo de los contenidos energéticos	193
6.2.6. Tratamiento de datos y análisis estadístico	193
6.3. RESULTADOS	195
6.3.1. Seguimiento de la evolución bioquímica de los desarrollos larvarios.....	195
6.3.2. Prueba de alimentación	200
6.3.3. Pruebas de ayuno	209
6.4. DISCUSIÓN	214
7. CONCLUSIONES -----	221
8. BIBLIOGRAFÍA -----	227



ABREVIATURAS y SÍMBOLOS



Ado	Cilios adorales
Blas	Blastoporo
Bra	Branquias
CACTI	Centro de Apoyo Científico - Tecnológico a la Investigación
Carb	Carbohidratos
Cél	Célula
Cha	Charnela
Cil	Cilios
cm	Centímetro
Cp	Corpúsculo polar
CV	Células vesiculares
D1	Dieta 1
D2	Dieta 2
D3	Dieta 3
Desv	Desviación típica
DHA	Ácido docosahexaenoico
Dig	Tracto digestivo
Dis	Disoconcha
€	Euro
E0	Estadío de reposo sexual
E1	Estadío de inicio de desarrollo gametogénico
E2	Estadío de gametogénesis avanzada
E3	Estadío de madurez y puesta
E4	Estadío de postpuesta
ESPC	Espermatocitos primarios
ESPC II	Espermatocitos secundarios
ESPD	Espermátidas
ESPG	Espermatogonias
ESPM	Espermatozoides maduros
ESPR	Espermatozoides residuales
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FOF	Folículos en formación
g	Gramos
GN	Gonias

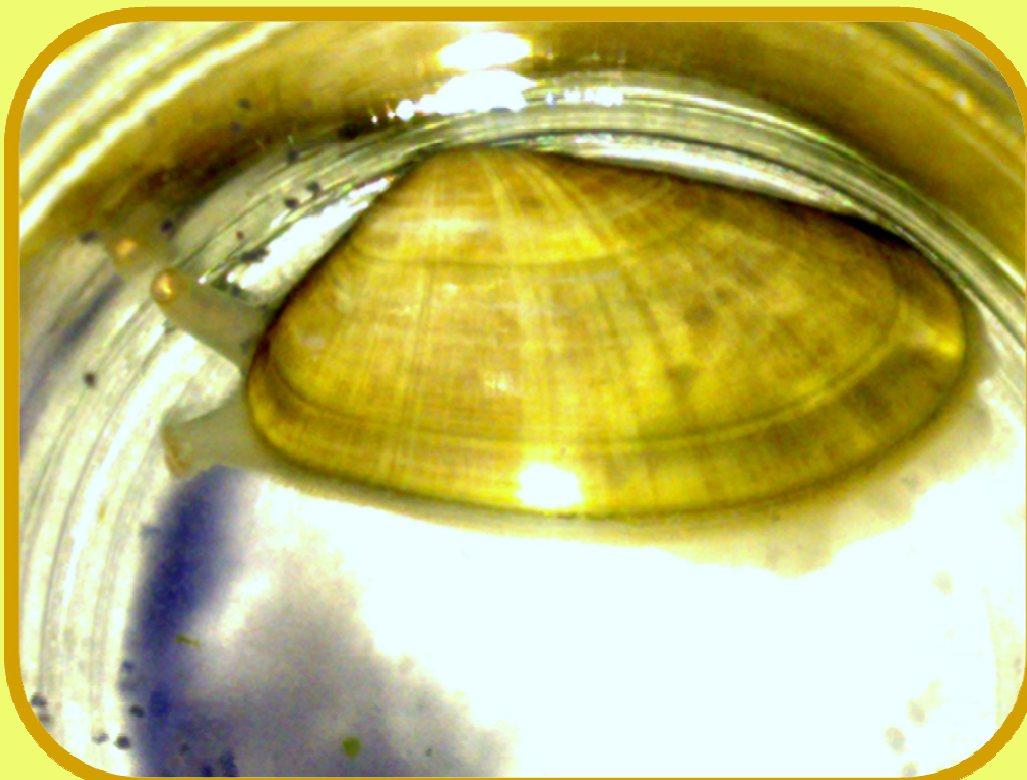
h	Hora
HMC	Hemocitos
hpf	Horas post-fertilización
ICG	Índice de condición gonadal
ICT	Índice de condición total
Igc	Invaginación de la glándula de la concha
Indiv/ind⁻¹	Individuo
INTECMAR	Instituto Tecnológico para el Control del Medio Marino
kJ	Kilojulio
kg	Kilogramo
L	Litro
Lip	Lípidos
m	Metros
M	Molar
Ma	Músculo aductor
min	Minutos
Mit	Mitocondrias
mg	Miligramo
mJ	Milijulio
mL	Mililitro
mm	Milímetros
MUSC	Músculo
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
NRC	National Research Council
OB	Ancho
OL	Longitud
OP	Ovocitos pedunculados
OPV	Ovocitos primarios o previtelogénicos
OVOC	Ovocitos maduros
OVOG	Ovogonias
OVOCR	Ovocitos residuales
Pa	Penacho apical
Per	Periostraco

Pos	Cilios postorales
POST	Larva postmetamórfica
Ppa	Penacho post-anal
ppm	Partes por millón
Pre	Cilios preorales
PRE	Larva premetamórfica
Pro	Prototroca
Prot	Proteínas
PRO I	Prodisoconcha I
PRO II	Prodisoconcha II
PVC	Policloruro de vinilo
R²	Coeficiente de ajuste
Rma	Reborde muscular del manto
SIGPAC	Sistema de Información Geográfica de parcelas agrícolas
SEM	Microscopio electrónico de barrido
<i>sp</i>	Especie
T₀	Tiempo de fertilización
T1	Células secretoras del periostraco
T2	Células secretoras del ligamento
T3	Células secretoras de la matriz orgánica de la concha
(T1,5)	Tamiz de malla superior a 1.500 µm
(T2)	Tamiz de malla superior a 2.000 µm
(T2,5)	Tamiz de malla superior a 2.500 µm
(T3)	Tamiz de malla superior a 3.000 µm
(T4)	Tamiz de malla superior a 4.000 µm
TC	Tejido conectivo
Tel	Telotroca
TEM	Microscopio electrónico de transmisión
<i>T-iso</i>	<i>Isochrysis aff. galbana</i>
Umb	Umbo
UV	Ultravioleta
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µm	Micrómetro

Ve	Velo
Va	Valva
WoRMS	World Register of Marine Species
°C	Grado centigrade
λ	Longitud de Onda



1. Introducción general





1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. CLASIFICACIÓN, HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN

Donax trunculus (Linnaeus, 1758), denominada comúnmente coquina y cadelucha en Galicia, es una especie de molusco bivalvo cuya clasificación taxonómica propuesta por el World Register of Marine Species (WoRMS) (Gofas, 2015), es la siguiente:

- **Phylum** Mollusca
- **Clase** Bivalvia Linnaeus, 1758
- **Subclase** Heterodonta Neumayr, 1884
- **Orden** Veneroida Gray, 1854
- **Superfamilia** Tellinoidea Blainville, 1814
- **Familia** Donacidae Fleming, 1828
- **Género** *Donax* Linnaeus, 1758
- **Especie** *Donax trunculus* Linnaeus, 1758

Dentro del género *Donax* se han descrito aproximadamente 64 especies, de las cuales en torno a un 74% se encuentran en aguas tropicales, un 21% habitan en aguas templadas y solo un 5% se distribuyen en áreas de agua fría. No se han encontrado especies del género *Donax* en latitudes altas, océanos Ártico y Antártico (Ansell, 1983).

D. trunculus, es una especie de distribución atlántico – mediterránea (Figura 1.1). Se extiende a lo largo del Atlántico, costa portuguesa, norte de España, Mar Negro y por todo el Mediterráneo, costa francesa, Italia, España y norte de África hasta Senegal (Bayed y Guillou, 1985).

La coquina vive enterrada en bancos arenosos a pocos centímetros de la superficie. Habita en el submareal alto y la franja intermareal, entre las líneas de bajamar y pleamar, en playas expuestas dominadas por los procesos físicos de las mareas y acción del oleaje. Este bivalvo migra con las mareas, es transportado de un modo pasivo y utiliza el pie para detenerse y enterrarse en la zona intermareal. En

1. Introducción general

cuanto a su distribución batimétrica, los ejemplares pueden encontrarse entre los 0 y 2 metros de profundidad en la costa mediterránea y entre los 0 y 6 metros en la costa atlántica (Gaspar *et al.*, 2002).



Figura 1.1. Distribución geográfica.

Factores como la textura del sedimento, batimetría y materia orgánica del sustrato, influyen en la distribución espacial de *D. trunculus* (Salas, 1987). La coquina se asocia a bancos de arena fina, preferentemente ubicados en la zona intermareal, donde el hidrodinamismo y fuerte oleaje no permiten un excesivo depósito de materia orgánica, por otro lado, este bivalvo es suspensívoro (Moüeza, 1976), por lo que las zonas de rompiente aseguran una renovación constante del fitoplancton existente. Existen autores que relacionan el tamaño del individuo con su distribución espacial en el banco, Gaspar *et al.* (2002), encuentran que los individuos de pequeño tamaño presentan una distribución batimétrica más superficial que los de mayor tamaño. Esto se puede interpretar como una estrategia para superar la competencia intraespecífica entre individuos adultos y juveniles. Esta distribución espacial es también observada por Guillou y Le Moal (1978) en la costa francesa.

1.2. MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA

La concha de la coquina presenta forma de triángulo escaleno, también descrita como cuneiforme por presentar forma de cuña (Bucquoy *et al.*, 1898). Su composición es de naturaleza calcárea. Posee dos valvas iguales, con bordes fuertemente dentados, unidas por una charnela con dos dientes cardinales en cada lado y con un frágil ligamento que abre las valvas en su región dorsal. Estas se cierran por medio de fuertes músculos aductores. El umbo aparece muy desplazado hacia la parte anterior.

La forma de la concha está diseñada para permitir al individuo una fácil penetración en el sustrato, estos bivalvos se consideran buenos excavadores, su capacidad de enterramiento les permite estar adaptados a la vida en zonas batidas. La profundidad de enterramiento oscila de pocos centímetros a un metro.

La superficie de la concha en *D. trunculus* es lisa y brillante, con líneas de crecimiento no muy notables al tacto, la coloración es variable apareciendo ejemplares en tonos amarillo, tostado y violáceo (Figura 1.2).



Figura 1.2. Diferentes coloraciones de la coquina.

El interior de la valva puede aparecer con coloraciones entre blanquecina y violácea, y en ella se aprecia la línea paleal, resultado de la impresión que deja el reborde del manto, un seno paleal y la inserción de los músculos aductores (Figura 1.3).

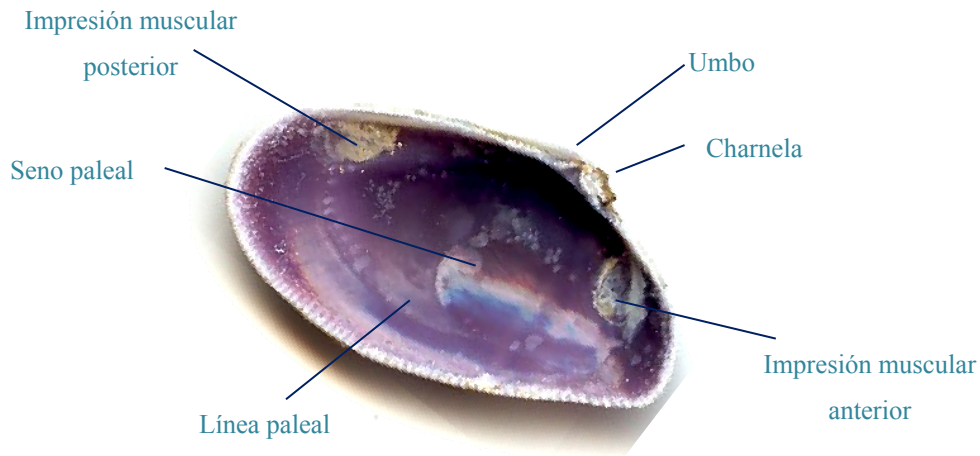


Figura 1.3. Parte interior de la valva izquierda de la coquina.

Las valvas encierran el cuerpo del individuo (Figura 1.4) constituido por masa visceral, reborde del manto y pie. Dentro de la masa visceral se localizan el aparato digestivo, respiratorio, circulatorio, reproductor y excretor. El manto protege todas estas estructuras y el volumen interno que delimita se denomina cavidad paleal, la cual se abre al exterior en dos puntos: los sifones, inhalante y exhalante y el pie, órgano musculoso y contráctil que permite al individuo enterrarse en el sustrato.

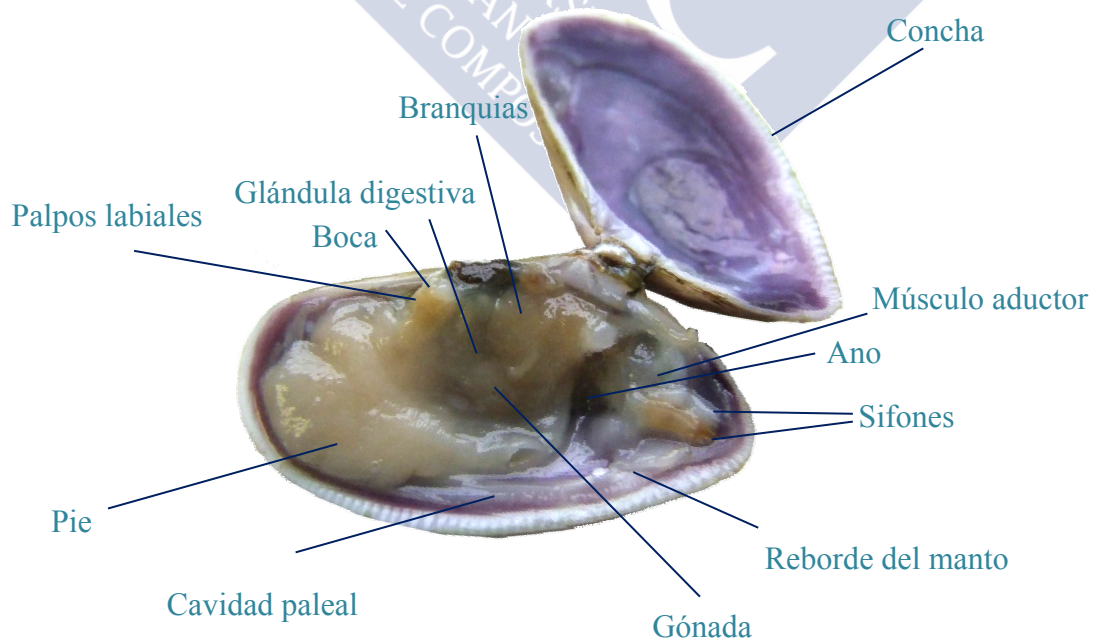


Figura 1.4. Anatomía de la coquina.

1.2.1. Aparato circulatorio

La coquina posee un sistema de circulación abierto. El corazón se localiza en posición dorsal albergado en una cavidad pericárdica, esta cavidad tiene un papel importante en la distribución de la hemolinfa a las distintas partes del individuo. Está constituido por un ventrículo fusiforme de fuertes paredes musculares y dos aurículas que además de comunicar entre sí, conectan con el ventrículo a través de su cara interna (Moúeza y Frenkiel, 1978). Las aortas, una anterior y otra posterior, expulsan la hemolinfa que se distribuye a las diferentes partes del cuerpo a través de arterias y arteriolas. El sistema arterial concluye en espacios libres en el tejido conjuntivo denominados lagunas.

1.2.2. Aparato respiratorio

La respiración se lleva a cabo por las branquias, localizadas a ambos lados de la masa visceral. Los filamentos o ctenidios que la constituyen presentan una forma de W de modo que, del eje superior de la branquia, salen dos ramas descendentes y luego otras ascendentes más cercanas al manto, la branquia queda entonces dividida en dos hemibranquias, constituidas por numerosos filamentos completamente unidos formando una superficie laminar sólida.

Estas branquias tienen una doble función: el intercambio gaseoso que comprende la respiración (captación de oxígeno y liberación de anhídrido carbónico) y, sobre todo, la filtración del alimento.

1.2.3. Aparato digestivo

Los sifones (inhalante y exhalante) se encuentran totalmente separados en la coquina. El agua, que penetra en la cavidad paleal a través del sifón inhalante, sufre una doble filtración: a nivel del propio sifón y a nivel de las branquias. El sifón inhalante, más corto que el exhalante, se encuentra tapizado por una corona de tentáculos: 6 primarios, 6 secundarios, 12 terciarios y 24 cuaternarios, todos ellos desempeñan un papel de filtración (Moúeza, 1976).

El segundo nivel de filtración lo constituyen las branquias a través del movimiento de las células epiteliales ciliadas que recubren la branquia, las partículas seleccionadas, embebidas en una sustancia mucosa, son transportadas hacia los palpos labiales y la boca, que se encuentran en la parte posterior del animal. Las partículas filtradas que son rechazadas como alimento, se aglutinarán en la cavidad paleal constituyendo las pseudoheces y serán expulsadas al exterior a través del sifón exhalante. Tras un breve recorrido por el esófago, el alimento llega al estómago donde es digerido por acción del estilo cristalino que tritura las partículas mediante un movimiento giratorio y produce enzimas que permiten una semidigestión extracelular, de ahí van a la glándula digestiva, donde se realiza una digestión intracelular para desembocar finalmente en la cavidad paleal a través del ano, próximo al sifón exhalante.

1.2.4. Aparato excretor

Consta de un riñón donde la hemolinfa es purificada para pasar de nuevo a las branquias a través de los vasos branquiales aferentes. En ellas recibirá una nueva carga de oxígeno antes de retornar al corazón.

1.2.5. Sistema nervioso

Este sistema está integrado por tres pares de ganglios: cerebro-pleurales, viscerales y ganglios del pie. Los ganglios cerebrales, localizados en las proximidades de la boca, actúan sobre la región anterior y cada uno establece conexión enervando el pie y la región posterior del manto. Los ganglios viscerales enervan la masa visceral y las branquias.

1.2.6. Aparato reproductor

En la coquina, la gónada es la organización anatómica pluricelular donde se desarrollan las líneas germinales que darán lugar a los gametos. El tejido gonadal está constituido por folículos, que son estructuras en forma de acino, tapizadas por células fibroblásticas (entre las cuales se encuentran las líneas germinales masculinas o femeninas) y miocitos, células musculares que, al contraerse, expulsan los gametos

hacia los gonoductos, la expulsión de los gametos maduros se produce mediante los movimientos ciliares de las células que tapizan dichos gonoductos.

La fecundación es externa, los gametos maduros femeninos y masculinos (ovocitos y espermatozoides), son expulsados a través del sifón exhalante al medio donde tiene lugar la fecundación. Transcurrido el proceso de fertilización, comienza el desarrollo embrionario que culminará con la aparición de la primera forma larvaria.

La coquina, *D. trunculus*, es una especie gonocórica, presenta sexos separados. En períodos de madurez, la gónada ocupa gran parte del individuo diferenciándose el sexo por su coloración, violácea en hembras y blanquecina en machos.

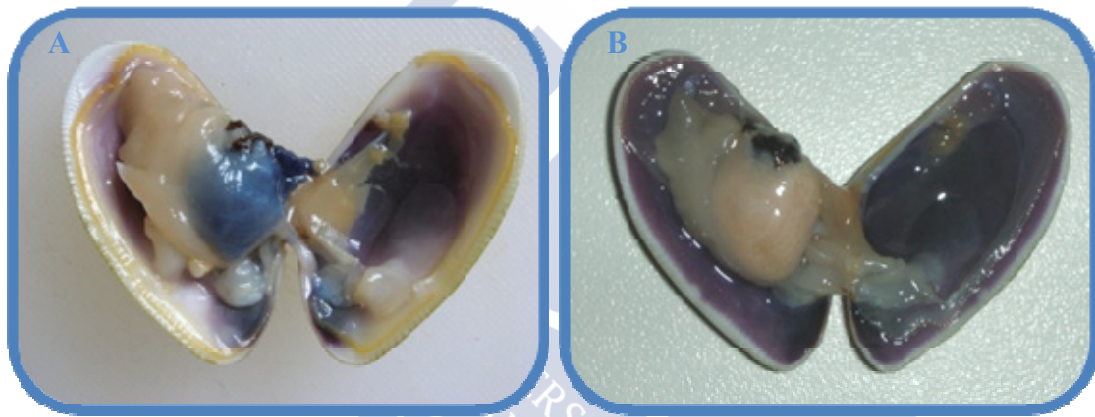


Figura 1.5. (A-B). A) Hembra madura. B) Macho maduro.

1.3. CICLO VITAL

Tras la aparición del huevo, el desarrollo de las larvas es indirecto pasando por distintas fases larvarias planctónicas (Figura 1.6). La primera es la trocófora que está provista de una corona ciliada y se nutre a expensas del vitelo. La larva D se alimenta por sí misma de fitoplancton, a continuación se forma la larva umbonada; tiempo después comienza a desarrollarse el pie antes de que se produzca la desaparición del velo (larva pediveliger).

Al cabo de un mes de cultivo aproximadamente, se produce la metamorfosis, desaparece el velo por completo, aparecen las branquias y se pasa de la vida pelágica libre a la vida bentónica. El paso de larva a semilla supone el fin del desarrollo larvario.



Figura 1.6. Ciclo vital de la coquina.

1.4. PLANES DE EXPLOTACIÓN

Galicia es una comunidad donde la acuicultura, pesca y marisqueo constituyen sectores de especial relevancia. Los recursos marisqueros son fundamentales para el desarrollo de la industria pesquera, tanto en su vertiente extractiva como comercial, por lo que es preciso fomentar una planificación adecuada de los mismos.

El Estatuto de Autonomía de Galicia le atribuye a la Comunidad Autónoma, en sus artículos 27 y 28, la competencia exclusiva en materia de pesca en aguas interiores, marisqueo y acuicultura, así como la competencia para el desarrollo y ejecución de la legislación del Estado en el ámbito de ordenación del sector pesquero. En ejercicio de estas competencias se dictó la Ley 11/2008 del 3 de diciembre de Pesca de Galicia, modificada por la Ley 6/2009 del 11 de diciembre, donde se define el marisqueo como el ejercicio de una actividad extractiva, desarrollada a pie o desde embarcación, en la zona marítima o marítimo-terrestre dirigida de modo exclusivo, con artes selectivas y específicas, a la captura de una o varias especies de moluscos, crustáceos, tunicados, equinodermos y otros invertebrados marinos, con fines de comercialización.

El Decreto 423/1993 del 17 de diciembre, por el que se refunde la normativa vigente en materia de marisqueo, extracción de algas y cultivos marinos, modificado por el Decreto 237/2002, del 11 de julio, establece que la extracción de marisco y recolección de algas estarán sujetas al Plan General de Explotación Marisquera, aprobado con carácter anual por la Consellería do Medio Rural e do Mar.

Los Planes Generales de Explotación, se definen como un conjunto de normas y orientaciones, de periodicidad anual, destinadas a regular y programar la extracción y recolección de un determinado recurso, que solo podrá ser ejercida por personas y embarcaciones con permiso de explotación. Estos Planes serán aprobados por Orden de la Consellería do Medio Rural e do Mar, tras una consulta con las entidades representativas del sector.

Estos Planes incluyen:

❖ Planes de Explotación para autorizaciones marisqueras. Son elaboradas por sus entidades particulares y presentadas a las Xefaturas de Coordinación da Área do Mar de la Consellería do Medio Rural e do Mar. Deben incluir: número de mariscadores, períodos y zonas de explotación, número de días de actividad previstos, normas de comercialización, vigilancia y tope de capturas por especie, mariscador y día.

❖ Normas de Explotación para zonas de libre marisqueo, elaboradas por la Consellería do Medio Rural e do Mar. La Subdirección Xeral de Acuicultura puede modificar las especies, períodos y zonas de extracción establecidas.

❖ Planes específicos de Explotación para zonas de libre marisqueo, elaborados por las cofradías o entidades asociativas del sector, ajustándose a los Planes de Explotación.

En la tabla I se muestran las principales áreas de marisqueo de la coquina en la costa gallega, así como el régimen de las mismas.

Tabla I. Principales subzonas de explotación de la coquina en el litoral gallego. Régimen y modalidad de marisqueo.

Entidad	Régimen	Modalidad	Subzonas de explotación
Cofradía de Cedeira	Libre marisqueo	A pie	Playa de Vilarrube
Cofradías de O Vicedo y O Barqueiro	Libre marisqueo	A pie	Playa de Arealonga Lombo das Navallas
Cofradía de O Barqueiro-Bares	Libre marisqueo	A pie	Playa de Vilela
Cofradías de O Vicedo y Celeiro	Libre marisqueo	A pie	Playa de Abrela

En la actualidad la actividad pesquera, las artes y aparejos permitidos en Galicia, están regulados por el Decreto 424/1993 del 17 de diciembre. Tras este decreto se han formulado modificaciones posteriores para adaptar a la normativa las nuevas disposiciones comunitarias y estatales, así como para regular las nuevas artes de pesca y aparejos.

La extracción legal de la coquina se hace a pie utilizando artes específicas como son el fouciño o fouza, con forma de hoz pero adaptado a esta actividad y la rasca (Figura 1.7). El reglamento (CE) nº 850/1998 del Consejo del 30 de marzo, para la conservación de los recursos pesqueros a través de medidas técnicas de protección de los juveniles de organismos marinos, establece los tamaños mínimos de captura de modo que, la talla mínima de extracción de *D. trunculus* en Europa es de 25 mm, dentro de esta normativa, los países miembros pueden aumentar esta talla pero nunca disminuirla. En Galicia, la talla mínima de extracción es de 35 mm, muy superior a la existente en el Mediterráneo y sur de España donde está en 25 mm.

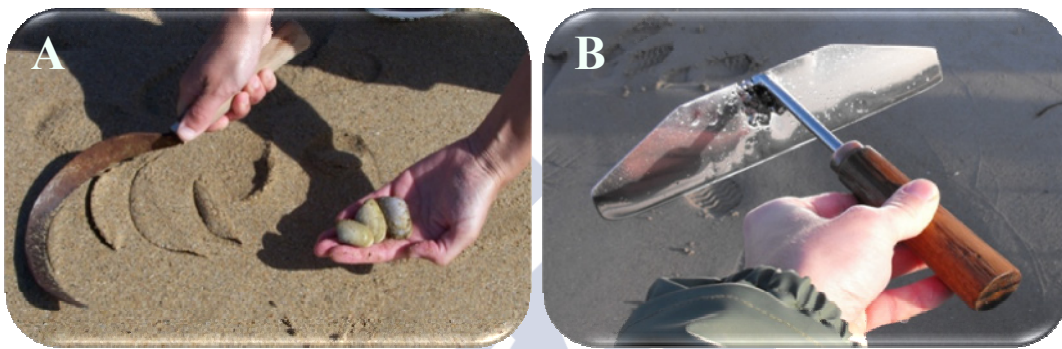


Figura 1.7 (A-B). Artes de marisqueo a pie para la extracción de la coquina. A) Fouciño (en uso en los bancos de Vilarrube). B) Rasca (utilizada en la Ría de Foz).

1.5. PRODUCCIÓN DE *DONAX TRUNCULUS*. SITUACIÓN ACTUAL DE LOS BANCOS DE COQUINA EN GALICIA

Los datos de producción de la coquina se han obtenido de la Plataforma Tecnológica de la Consellería do Medio Rural e do Mar a través de las ventas en lonja y centros autorizados para la primera venta de productos pesqueros frescos. En la actualidad, en la costa gallega, los bancos naturales de la coquina se están quedando sin recurso. Las lonjas de Baiona, Pobra do Caramiñal, Carnota (Lira), Fisterra, Corcubión, Cedeira, Espasante, O Barqueiro, O Vicedo, San Cibrao, Burela y Foz la extraían y comercializaban (Figura 1.8).

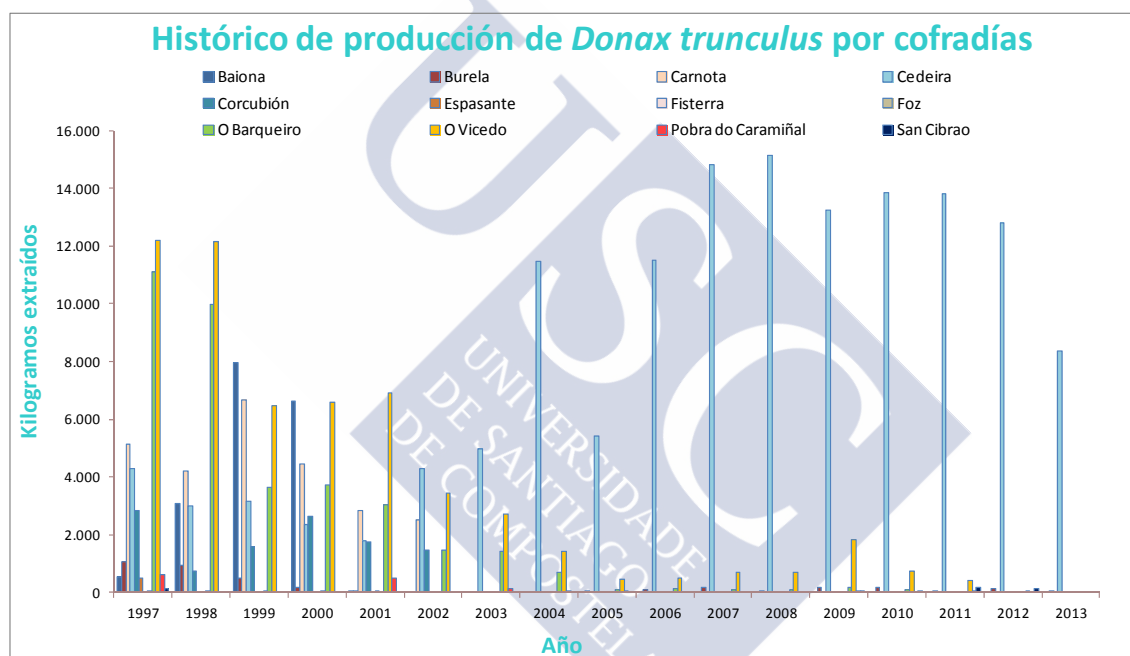


Figura 1.8. Histórico de la producción de coquina por cofradías. Datos de la Plataforma Tecnológica de la Consellería do Medio Rural e do Mar. Xunta de Galicia.

La considerable disminución de la especie en estos bancos provocó que, en los últimos años, solo Cedeira, O Vicedo y O Barqueiro, fuesen las lonjas donde continuó existiendo producción de *D. trunculus* (Figura 1.9). Sin embargo, en las lonjas de O Barqueiro y O Vicedo, no se registra producción de este bivalvo desde los años 2011 y 2012 respectivamente, a pesar de esto, se mantienen los Planes de Explotación a la espera de una recuperación de los bancos. Esta problemática está siendo abordada por una Acción de investigación integrada por Centros tecnológicos, Departamentos

territoriales y Universidades gallegas bajo el nombre de “Estudo dos bancos naturais de coquina: problemática da súa desaparición en Galicia”.

Las cofradías de O Vicedo y O Barqueiro realizaron durante años una explotación conjunta de los bancos marisqueros de la coquina, repartiéndose las siguientes áreas: Playa de Vilela, Lombo das Navallas y Playa de Abrela (Figura 1.9). En la Ría de O Barqueiro, la coquina se encontraba en su totalidad en zonas de libre marisqueo, entendiéndose como tales aquellos bancos naturales cuya explotación no está sujeta a una autorización o concesión administrativa. La Consellería competente determinará periódicamente las zonas de libre marisqueo, previa consulta con las organizaciones del sector.



Figura 1.9. Representación de las zonas de explotación de la coquina por parte de las cofradías de O Vicedo y O Barqueiro.

1. Introducción general

La playa de Vilela, situada en la banda este de la ría, la explotaba únicamente la cofradía de O Barqueiro desde el año 2002, bajo un Plan de Explotación de la coquina para zona de libre marisqueo.

El Lombo das Navallas, situado en el medio de la ría, tradicionalmente lo explotan en común las cofradías de O Barqueiro y O Vicedo, bajo un Plan de Explotación común.

La playa de Abrela, es también zona de libre marisqueo y se explotaba bajo un Plan conjunto entre las cofradías de O Vicedo y Celeiro, aunque la proporción de mariscadoras de Celeiro fue en los últimos años prácticamente anecdótica.

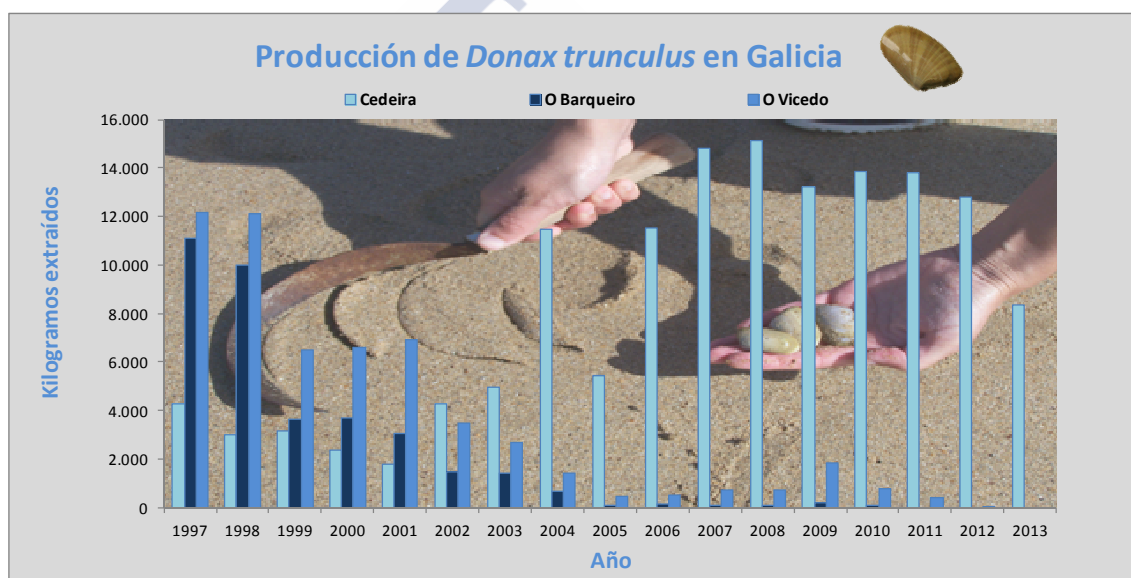


Figura 1.10. Representación de la producción en kilogramos para las cofradías de Cedeira, O Barqueiro y O Vicedo. Datos de la Plataforma Tecnológica de la Consellería do Medio Rural e do Mar. Xunta de Galicia.

D. trunculus, es considerada como una de las principales especies en las lonjas de Cedeira, O Vicedo y O Barqueiro dado su elevado índice de cotización, pues llega a generar ingresos más altos que otras especies de bivalvos dentro del sector marisquero. En la lonja de Cedeira es el molusco bivalvo más extraído y el que genera un mayor ingreso, en la lonja de O Barqueiro se localiza en quinta posición, con una extracción similar a la de la almeja fina y, en la lonja de O Vicedo, ocupa un tercer lugar superando la producción de especies como la almeja fina y la almeja japonesa.

La forma de venta de la coquina es mediante puja previa. El comprador, que ofrece el mejor precio antes de la extracción, será el que obtenga el producto comprometiéndose a retirar los quilos que salgan en las condiciones pactadas en la puja. Si no hay un acuerdo o si no se llega a un precio mínimo estipulado por las mariscadoras, se suspende la extracción. Las ventas para las extracciones del Plan común del Lombo das Navallas se realizan de una forma conjunta, se trata el precio y se vende en común. Las extracciones del banco de Vilela solo las comercializa O Barqueiro por el mismo sistema de puja previa. En el caso del banco de Abrela, el sistema de venta es el mismo que el empleado en los bancos de la Ría de O Barqueiro, mediante puja previa con un único comprador.

La coquina alcanza en primera venta un precio de en torno a los 30€/kg, muy superior al valor de esta especie en otras zonas de España y sur de Portugal. En O Vicedo y O Barqueiro la extracción de *D. trunculus* ha ido decreciendo con los años pasando de producciones de casi 5.000 kg (media de las dos cofradías) en el año 2001, a un mínimo de 283 kg en 2005. Solo ha experimentado un ligero ascenso en el año 2009 con una extracción de aproximadamente 1.000 kg (Figura 1.11). El precio sin embargo, ha evolucionado de manera creciente pasando de los 17 €/kg en 2001 hasta los 30 -35 €/kg en los últimos años.



Figura 1.11. Extracción y cotización media de la coquina en las lonjas de O Vicedo y O Barqueiro. Datos de la Plataforma Tecnológica de la Consellería do Medio Rural e do Mar. Xunta de Galicia.

La producción en la lonja de Cedeira, al contrario que en O Vicedo y O Barqueiro, se ha incrementado desde 2001 (1.796 kg extraídos) hasta los 8.000 kg que se extraen en la actualidad. Solo experimentó una caída (5.417 kg) en 2005, año en que se perdió la campaña por motivo de aparición de la marea roja durante la época de extracción (Figura 1.12). El precio también aumenta manteniéndose estos últimos años en torno a los 30 €/kg.

La compra en la lonja de Cedeira se efectúa mediante puja previa donde el comprador puja por la totalidad del producto, que se extraerá en un determinado período de tiempo (habitualmente por semana o por mes). El tope de recogida por mariscador y día, al igual que en O Vicedo y O Barqueiro, son 5 kg. Una vez extraído el producto, se traslada a un punto de control donde se pesa y se retira el excedente que es trasladado de nuevo al banco por grupos de mariscadoras.



Figura 1.12. Extracción y cotización de la coquina en la lonja de Cedeira. Datos de la Plataforma Tecnológica de la Consellería do Medio Rural e do Mar. Xunta de Galicia.

En Galicia el banco de Vilarrube, explotado por la cofradía de Cedeira, es por el momento el único con una abundante disponibilidad de coquina susceptible de marisqueo.

1.6. POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO

La población de la coquina objeto de estudio, es la procedente de la playa de Vilarrube en Valdoviño (NO Galicia), este banco se encuentra próximo a la Ría de Cedeira y es la cofradía de Cedeira la que explota el recurso.

La playa de Vilarrube es un banco de arena fina que se encuentra sometido a una inestabilidad del sedimento como consecuencia del fuerte oleaje. En este tipo de ambiente, las poblaciones de *D. trunculus* son capaces de alcanzar altas densidades (Gaspar *et al.*, 1999).

Está flanqueada por dos ríos que discurren por su extremo oriental y occidental, desembocando finalmente en la ría. El banco se encuentra dividido en tres áreas donde la distribución de la coquina es muy variable. La zona localizada en el extremo occidental recibe el nombre de ensenada de Pantín, la ensenada de Esteiro constituye el extremo oriental del banco y en el medio de las dos se localiza la zona Centro.

En este banco, *D. trunculus* se distribuía durante los años que duró este estudio de un modo específico (Figura 1.13); en el área de Esteiro se encontraban las coquinas de mayor tamaño pero en una cantidad no muy abundante, en esta zona discurre un río más caudaloso que el del extremo occidental. En Pantín es donde se encontró, generalmente, el núcleo más denso de la población, se caracterizó por presentar dispersión de talla además de ser considerada como una zona de criadero, pues es donde aparecía la inmensa mayoría de juveniles. Cuando en la zona de Pantín se produjo un descenso de población, se observó que estas se concentraban en la zona centro. Actualmente, el banco se ve sujeto a importantes movimientos del sustrato lo que hace cambiar, con bastante frecuencia, la distribución de los individuos (Informe interno del proyecto: Estudio de los bancos naturales de coquina: problemática de su desaparición en Galicia, 2013-2016).

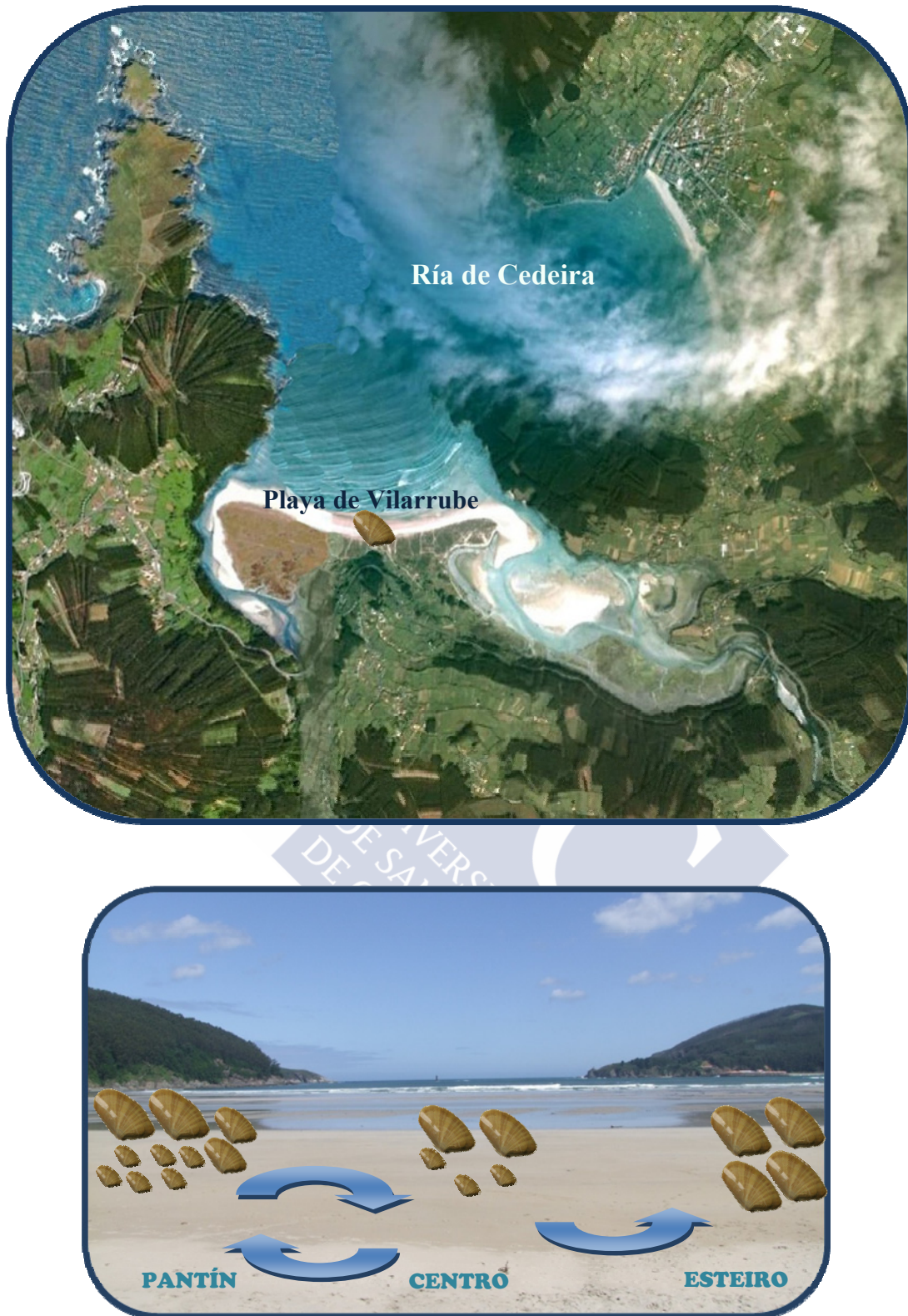


Figura 1.13. Playa de Vilarrube. Localización y distribución espacial de la coquina dentro del banco.

Actualmente la playa de Vilarrube es, dentro de la costa gallega, el banco con una mayor cantidad de coquina, la producción de este molusco es aquí notablemente superior a cualquier otro banco del litoral norte gallego. Es por tanto una población cuyo estudio resulta de interés y donde la disponibilidad de ejemplares permite llevar a cabo los muestreos necesarios.





2. Objetivos



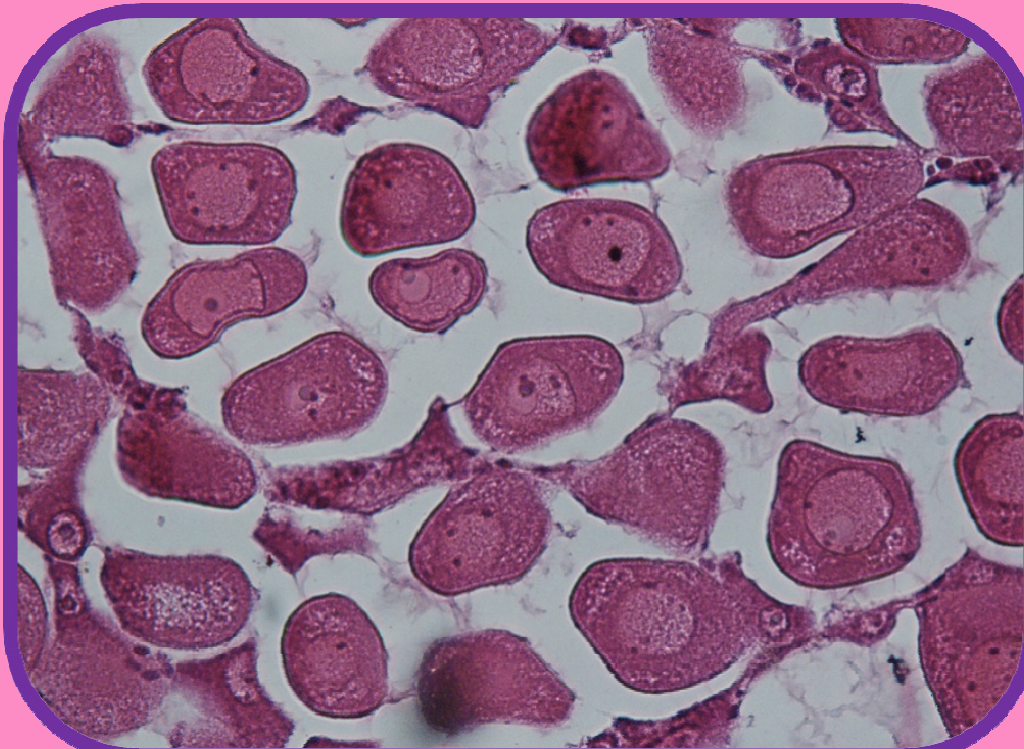


2. OBJETIVOS

1. Describir el ciclo gametogénico de la coquina mediante el estudio histológico de las gónadas y conocer la variación en la composición bioquímica mayoritaria a lo largo del ciclo, como estrategia para optimizar la obtención de puestas en laboratorio así como para mejorar la viabilidad de las mismas.
2. Descripción de los desarrollos embrionarios y larvarios de *Donax trunculus* mediante microscopía óptica y electrónica, como paso previo a realizar su cultivo en criadero.
3. Establecer un protocolo de cultivo en criadero de *D. trunculus*.
4. Determinar el patrón de crecimiento durante el preengorde de la coquina, conocer los tipos de estructura de cultivo y época adecuados. Estudio de la adaptación de semilla de *Donax trunculus* al medio natural. Viabilidad de repoblación.
5. Estudiar la variación en composición bioquímica durante el desarrollo larvario de la coquina. Determinar los requerimientos nutricionales y movimiento de reservas energéticas durante esta etapa y evaluar la resistencia de los individuos en períodos de ayuno.



3. Capítulo I. Ciclo gametogénico





3. CAPÍTULO I. CICLO GAMETOGENICO

3.1. INTRODUCCIÓN

Existen estudios sobre la biología de diferentes poblaciones de *D. trunculus* en varios puntos, como es el caso de Francia en su vertiente atlántica (Isla de Olerón) (Ansell y Lagardère, 1980), mediterránea (Ansell y Bodoy, 1979; Bodoy y Massé, 1979; Bodoy, 1982;) y en la Bahía de Douarnenez donde también se abordaron aspectos tales como la dinámica poblacional (Guillou, 1982; Guillou y Le Moal, 1978, 1980). Además, se han realizado trabajos relacionados con el ciclo reproductor de esta especie como son los de Badino y Marchionni (1972) en el litoral italiano; Mouëza y Frenkiel (1973) y Ansell *et al.* (1980) en las costas de Argel; Bayed (1990) en la costa de Marruecos; Mazé y Laborda (1990) en la Ría de O Barqueiro; Gaspar (1996) y Gaspar *et al.* (1999) en el sur de Portugal y Deval (2009) en el mar de Mármara, Tlili *et al.* (2011) realizan un estudio del ciclo gametogénico, reservas energéticas e índices de condición de la coquina en relación con los niveles de contaminación de sus lugares de origen.

Desde los 90, en el Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo, se pusieron a punto las técnicas para llevar a cabo el cultivo de la coquina, *Donax trunculus*. Fueron varios los estudios previos que contribuyeron a optimizar el cultivo de la especie en criadero. Fernández Otero (1982) estudió en la Ría de O Barqueiro una población de coquina y trasladó individuos maduros al criadero para la obtención de desoves. En 1993, Martínez y colaboradores realizaron un estudio más profundo sobre *D. trunculus*, estableciendo su período de madurez sexual durante la primavera y verano, además estos autores describieron una escala de madurez sexual para la población existente en ese banco y pusieron de manifiesto las variaciones en la composición bioquímica mayoritaria de los progenitores a lo largo del ciclo gametogénico de la especie. Este trabajo se complementó diez años más tarde con el estudio de la talla mínima de maduración sexual de *D. trunculus* en el mismo banco (Martínez *et al.*, 2003).

El ciclo reproductivo en los bivalvos comprende una activación gonadal e inicio gametogénico. Una vez que la gónada se encuentra en su estado máximo de desarrollo y

3. Ciclo gametogénico

las células sexuales adquieren su total madurez, tiene lugar un período de puesta con la expulsión de gametos y una posterior regresión gonadal. Dentro del ciclo, se distinguen por tanto dos etapas: una reproductiva, que comienza con el inicio del desarrollo gametogénico y culmina con la expulsión de gametos al exterior y un período de reposo o inactividad sexual. Estas fases, que funcionan en coordinación con los cambios estacionales del medio, producen el modelo característico de cada especie, que es diferente según la localización de la población.

La espermatogénesis o formación de gametos masculinos y la ovogénesis, formación de gametos femeninos, tiene lugar en los folículos gonadales donde se suceden una serie de líneas germinales que, mediante procesos de mitosis, meiosis y diferenciación, generarán una fase haploide o gameto.

La espermatogénesis en bivalvos se puede dividir en tres fases: la primera o espermatocitogénesis, relacionada con la multiplicación mitótica y la maduración de las espermatogonias, la segunda o meiosis y la tercera o espermiogénesis, que abarca la transformación de espermátidas en espermatozoides (Ortíz *et al.*, 2003). Las espermatogonias sufren mitosis dando lugar a espermatoцитos primarios, los espermatoцитos secundarios se originan a partir de una meiosis de los primarios. Estos, por división, dan lugar a las espermátidas que sufren una compleja diferenciación dando lugar al espermatozoide maduro constituido por cabeza, cuello y flagelo. Las células más tempranas se localizan próximas a la pared del folículo, el desarrollo de las siguientes líneas germinales se produce de una forma centrípeta hacia el lumen del folículo.

En la ovogénesis, las ovogonias se encuentran adheridas a la pared del folículo, estas duplicarán su ADN dando origen al ovocito primario. En la primera división meiótica, queda el ovocito primario retenido en el estado paquiteno - diploteno de la profase, hasta completar la vitelogénesis (Lubet, 1996). Al concluir la primera meiosis, se constituye el ovocito secundario que, tras la segunda meiosis, se transformará en un ovocito biológicamente maduro.

Para el estudio del ciclo gametogénico en los bivalvos, existen distintos métodos que se pueden clasificar en indirectos y directos. Los primeros, consisten en realizar una

estimación de la presencia de larvas en el plancton o en ver la posterior fijación de postlarvas o semilla. Los métodos directos, sin embargo, consisten en estudios del tejido gonadal de los individuos. En la actualidad, son los métodos directos los que aportan una información más fiable.

Dentro de estos, existen los que se basan en un estudio macroscópico de la gónada y que constan de una observación de la coloración, tamaño y el aspecto de la misma, como el estudio realizado en venéridos por Glemarec y Bouron (1978). También existen los que se apoyan en la elaboración de índices de condición gonadales y por último, están aquellos métodos directos que se basan en observaciones microscópicas, ya sean de frotis *in vivo* de la gónada, como el elaborado por Lucas (1965), o de las preparaciones histológicas de tejido gonadal.

Para determinar el grado de desarrollo gametogénico de los individuos a partir de la observación de preparaciones histológicas, se pueden utilizar escalas cualitativas que se basan en describir las etapas por las que pasa la gónada durante el ciclo. A lo largo de los años se han desarrollado numerosas escalas histológicas, diferenciándose en el número y características de cada estadio gonadal. En los bivalvos cabe destacar las escalas de Holland y Chew (1974) y Xie y Burnell (1994) descritas para la almeja japonesa, y las de Lubet (1959) y Wilson y Seed (1974) descritas para el mejillón. Más recientemente se han descrito escalas para especies como *Ensis siliqua* (Linnaeus, 1758) y *Solen marginatus* Pulteney, 1799 (Martínez, 2002) y para la almeja babosa (Cervíño-Otero, 2011). En *D. trunculus*, preceden a este trabajo las escalas descritas por Martínez *et al.* (1993), Gaspar (1996) y Gaspar *et al.* (1999).

En los últimos años se han desarrollado otros métodos de naturaleza cuantitativa como es el estereológico. En los venéridos, la utilización de este método abarca desde estudios de distribución de frecuencia de talla de ovocitos por análisis de imagen (Morvan y Ansell, 1988; Xie y Burnell, 1994), hasta cálculos de las fracciones de volumen ocupadas por los diversos tipos celulares (Rodríguez Moscoso, 2000).

En el caso de la coquina, *D. trunculus*, la bibliografía pone de manifiesto el empleo de métodos directos para el estudio del ciclo gametogénico. De este modo, Mouëza y Frenkiel (1973) en la bahía de Bou Ismaïl y Bayed (1990) en la costa

3. Ciclo gametogénico

atlántica de Marruecos, combinaron la descripción macroscópica de individuos basándose en el grosor, color y opacidad de la gónada con el uso de preparaciones histológicas para determinar el estado de madurez de las poblaciones de coquina existentes en esos bancos. Martínez *et al.* (1993, 2003) en la Ría de O Barqueiro, hicieron uso de la histología para describir una escala que permitió determinar el ciclo gametogénico de *D. trunculus*. En la costa portuguesa, Gaspar *et al.* (1999) emplearon la observación de la coloración de la gónada para identificar la *sex ratio* de la población en períodos de madurez y para asignación de un estadio gonadal a cada individuo, examinaron preparaciones histológicas de las gónadas. Otros autores como Deval (2009) en el mar de Mármara y Boussoufa *et al.* (2011) en la costa de Túnez, emplean índices de condición para el estudio de las variaciones estacionales y reproducción de *D. trunculus*.

La estacionalidad y duración de la actividad reproductiva viene determinada por una interacción entre factores exógenos, principalmente la temperatura y la disponibilidad de alimento, y factores endógenos de tipo endocrino y neuronal. Estos factores influyen, en mayor o menor medida, sobre la gametogénesis dependiendo de la especie, de forma que en diferentes localidades el ciclo gametogénico de una misma especie puede sufrir variaciones por algunos de estos parámetros (Barber y Blake, 1991).

Los bivalvos marinos muestran ciclos de almacenamiento y utilización de energía íntimamente ligados con el ciclo gametogénico. Según Gabbot (1983), las actividades metabólicas estacionales son un reflejo de complejas interacciones entre el alimento disponible, condiciones ambientales, crecimiento y actividad reproductora. Ruiz (1992) hace referencia a condicionantes internos y externos de los cuales dependen los procesos de acumulación y gasto de nutrientes; entre los condicionantes internos estaría el ciclo reproductivo y entre los externos, la disponibilidad de alimento en el medio como fuente de reservas.

La composición de proteínas, carbohidratos y lípidos de los organismos informan del estado fisiológico y de desarrollo de los mismos. En los bivalvos existen dos procesos que determinan cambios fundamentales de la composición bioquímica de los animales: la gametogénesis y el desarrollo larvario. El glucógeno y las proteínas se usan para la producción del tejido reproductivo y la proliferación de los gametos,

mientras que los lípidos suelen ser la reserva energética fundamental de los ovocitos (Gallager *et al.*, 1986; Martínez-Pita *et al.*, 2012; Whyte *et al.*, 1991).

El glucógeno está considerado como el principal componente de las reservas en los bivalvos marinos (Giese, 1967). Debido a su carácter hidrosoluble, los carbohidratos son reservas de las que se puede hacer un uso inmediato, lo cual facilita su movilización hacia los tejidos. Esto permite cubrir necesidades energéticas tanto de mantenimiento, en épocas de baja disponibilidad de alimento, como relacionadas con los períodos reproductivos. Los carbohidratos juegan un papel como constituyentes energéticos esenciales, con capacidad de sostener el esfuerzo reproductor (Gabbot y Bayne, 1973; Wilson y Seed, 1974; Mann, 1979). Durante el desarrollo gonadal se produce la conversión metabólica de glucógeno en lípidos (Gabbott, 1975).

Los lípidos, generalmente menos importantes desde el punto de vista del aporte energético (Giese, 1966; Ackman, 1989; Besnard *et al.*, 1989), presentan una excelente capacidad de ser almacenados. Según Beninger y Lucas (1984) constituyen parte de las reservas en épocas nutricionales deficitarias. Muchos autores destacan su importancia para la formación de gametos (Holland, 1978) al constituir la principal reserva de energía de los ovocitos y larvas de bivalvos.

En cuanto a las proteínas se les atribuye una función principalmente estructural, sin descartar su papel como reserva energética en bivalvos adultos, particularmente durante la gametogénesis (Holland, 1978), en situaciones de bajos niveles de carbohidratos o severos desequilibrios metabólicos (Beninger y Lucas, 1984). Adachi (1979) encontró que el nivel de proteínas tiene relación con el desarrollo de la gónada en la almeja japonesa, sugiriendo que la proteína del músculo aductor puede ser utilizada para la producción de la gónada. Por otro lado, Jara Jara (1995), en *Venerupis corrugata* (Gmelin, 1791) y *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758), encuentra que el papel de las proteínas en el metabolismo energético es poco importante respecto a los anteriores componentes bioquímicos mayoritarios.

Los cambios en la composición bioquímica relacionados con el ciclo gametogénico en los moluscos bivalvos marinos fueron abordados por varios autores, así en la familia Veneridae (Ansell *et al.*, 1964; Beninger y Lucas, 1984; Robert *et al.*,

3. Ciclo gametogénico

1993; Rodríguez Moscoso *et al.*, 1993; Rodríguez Moscoso y Arnáiz, 1998; Ojea *et al.*, 2001, 2004, 2005; Cerviño Otero, 2005, 2011; en la familia Pharidae (Darriba, 2001; Martínez, 2002); en la familia Solenidae (Martínez, 2002) y en la familia Donacidae (Ansell *et al.*, 1980; Martínez *et al.*, 1993).

El conocimiento del ciclo gametogénico de una especie es importante a la hora de abordar su cultivo en criadero. Tras una descripción del ciclo reproductivo de la coquina, acompañado de un estudio histológico y análisis bioquímico, se pueden determinar aspectos como: tallas de primera maduración, períodos de puesta y requerimientos de la especie para su cultivo. El objetivo es optimizar la obtención de puestas en el criadero y viabilidad de las mismas, además de conocer la relación que existe entre la variación en la composición bioquímica y los distintos estadios del ciclo gametogénico en el medio natural.

En este capítulo se define el ciclo gametogénico de la coquina en el banco de Vilarrube, ubicado al noroeste de Galicia, mediante la observación de preparaciones histológicas, estudio de índices de condición y el empleo de una escala cualitativa, para definir cada estadio, adaptada a esta especie, además del estudio histológico, se llevó a cabo un análisis de la composición bioquímica de la gónada y víscera de la coquina para determinar los cambios en la composición bioquímica en las diferentes fases del ciclo. Su objetivo es establecer la relación que existe entre esta variación y los distintos estadios de su ciclo gametogénico en el medio natural.

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1. Recogida y procesado

Para la recolección de ejemplares, las artes permitidas, según la legislación vigente, son: el fouciño o fouza y la rasca. La talla de los individuos fue alrededor de la talla comercial (35 mm) y fueron transportados en frío al Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo.

Una vez en el criadero, los individuos se colocaban en agua de mar en circuito abierto durante 24 horas para eliminar la arena y restos de materia orgánica que traían del medio natural.

Parte de estas coquinas se utilizaron para el estudio histológico y análisis bioquímico, el resto se mantuvieron en el criadero para la obtención de desoves y para cultivo.

Se procesaron un total de 30 individuos, número que posteriormente se incrementó hasta un máximo de 60 por necesidades de cantidad de muestra para el análisis bioquímico.

Se toman los siguientes datos biométricos:

- Largo o eje antero-posterior
- Alto o eje dorso-ventral
- Anchura máxima (grosor)
- Peso fresco total

Se abren separando la concha del cuerpo o carne del animal y con una balanza se obtienen:

- Peso fresco de la carne
- Peso fresco de la concha

3.2.2. Índice de condición

Obtenido el peso fresco de la carne y el peso fresco de la concha, se calculó el siguiente índice de condición:

$$IC = (\text{Peso fresco carne} / \text{Peso fresco concha}) * 100$$

3.2.3. Histología

El procesado para la obtención de cortes histológicos a partir de gónadas de coquina, consta de los siguientes pasos (Figura 3.1)



1° Introducción de gónadas en fijador Davidson durante 48 horas

2° Deshidratación mediante baño creciente de alcoholes en procesador automático de tejidos Histolab ZX-100

- 1°/ 1x alcohol 70°
- 2°/ 1x alcohol de 80°
- 3°/ 3x alcohol de 96°
- 4°/ 2x alcohol de 100°
- 5°/ 1x 1:1 alcohol de 100° y xileno
- 6°/ 2x xileno
- 7°/ 2x parafina a 60°C

3° Formación de bloques de parafina en un centro formador, donde las muestras quedan embebidas en bloques sólidos de parafina

4° Cortes histológicos de 5 µm de grosor en microtomo Microm HM340E



5° Introducción de los cortes en baño de agua a 40°C y montaje en portaobjetos empapado en gelatina

6° Secado de los cortes en estufa a 40°C

7° Desparafinado e hidratación

- 1°/ 3x xileno
- 2°/ 1x alcohol de 100°
- 3°/ 1x alcohol de 96°
- 4°/ 1x alcohol de 80°
- 5°/ 1x alcohol de 70°
- 6°/ 1x alcohol de 50°
- 7°/ 1x agua destilada

8° Preparación de colorantes para tinción

Hematoxilina de Harris

Solución A: Hematoxilina + alcohol 100°

Solución B: Sulfato de aluminio y potasio + agua destilada

Reposo 24 horas

Adición de óxido de mercurio

Ebullición a 100°C

Enfriado y adición de timol y ácido acético

Eosina

Eosina

+

agua destilada

+

ácido acético

9° Tinción de los cortes

- 1°/ 1x hematoxilina de Harris
- 2°/ 1x agua corriente en cascada
- 3°/ 1x eosina
- 4°/ 4x alcohol de 100°
- 5°/ 3x xileno

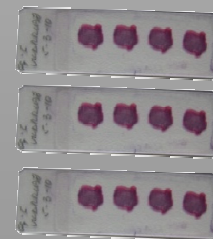


Figura 3.1. Esquema del procesado de gónadas para la obtención de cortes histológicos.

La escala de maduración gonadal de la coquina en este trabajo se basa en la utilizada por Fernández Otero (1982); Martínez *et al.* (1993, 2003) en la Ría de O Barqueiro y en la descrita por Gaspar (1996) en moluscos bivalvos del sur de Portugal. La descripción de las diferentes fases de madurez gonadal de la coquina, es la siguiente:

E0. Reposo sexual

El sexo no es diferenciable a nivel macroscópico ni microscópico, debido a que no aparecen folículos en el tejido gonadal. Se caracteriza este estadio por una abundancia de tejido conectivo, con una gran cantidad de hemocitos.

E1. Inicio del desarrollo gametogénico

Comienza el proceso de formación de gametos. Macroscópicamente el sexo no es diferenciable, pero en las preparaciones histológicas se puede diferenciar el sexo. Se observan folículos formados, rodeados por una capa de tejido conectivo, con un alto porcentaje de células germinales adheridas a sus paredes. En las hembras se ven ovogonias y ovocitos en su primera fase de desarrollo; en los machos, espermatogonias y algún espermatozoides primario formando bandas centrípetas en la pared folicular, pero serán las células vesiculares las que ocupen la mayor parte de la superficie folicular.

E2. Gametogénesis avanzada

Los folículos ocupan gran parte de la gónada. El sexo prácticamente es diferenciable en todos los individuos que se encuentran en este estadio a nivel microscópico e incluso macroscópico. En el folículo se aprecia un porcentaje menor de células vesiculares que comienzan a desaparecer y aún existe presencia hemocitaria. En las hembras se observan ovocitos maduros acompañados de líneas germinales más tempranas, tales como ovocitos primarios que están saliendo de la pared folicular y ovocitos pedunculados. En los machos se ven los primeros espermatozoides en el lumen, acompañados de líneas germinales tempranas, espermatogonias, espermatozoides y espermátidas que se desarrollan concéntricamente hacia el interior del folículo.

E3. Madurez y puesta

La gónada se encuentra en el grado más alto de desarrollo. El sexo ya es diferenciable macroscópicamente en todos los individuos. No se observan células vesiculares ni hemocitos. En las hembras se aprecian ovocitos totalmente maduros, con núcleo formado, libres en el lumen y ovocitos pedunculados que aún no se han despegado de la pared folicular. En los machos, el folículo en su totalidad, está prácticamente lleno de espermatozoides, quedando en la zona más externa del folículo dos líneas germinales que se desarrollarán dando lugar a espermatozoides.

E4. Postpuesta

Es el estadio resultado del vaciado gonadal tras la puesta. En las hembras se ven folículos prácticamente vacíos y otros con ovocitos residuales. En los machos se aprecia también una reducción folicular y aparecen espermatozoides residuales dentro y fuera del folículo. Se observa proliferación del tejido conectivo y una elevada presencia hemocitaria.

3.2.4. Bioquímica

Se analizó la composición bioquímica mayoritaria (carbohidratos, lípidos y proteínas) en la gónada y víscera (carne menos gónada) de la coquina.

Las muestras se extraen, diseccionando la carne de cada individuo separando la gónada del resto y se obtiene:

- Peso fresco de la gónada
- Peso fresco de la víscera (carne menos gónada)

Para determinar los pesos secos, las muestras previamente congeladas a una temperatura de -70°C , se liofilizaron durante 24 – 48 h, dependiendo de la cantidad de muestra. Posteriormente, se introdujeron durante 1 h en un desecador, y pasado este tiempo se pesaron, obteniendo:

- Peso seco de la gónada
- Peso seco de la víscera (carne menos gónada)

3. Ciclo gametogénico

De las muestras, previamente liofilizadas y trituradas, se tomaron dos alícuotas de: 2-3 mg para carbohidratos; 200 mg para lípidos y 1-2 mg para proteínas. Los análisis por duplicado, se realizaron siguiendo los métodos que se describen en las figuras 3.2; 3.3 y 3.4.

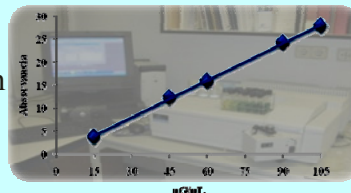


Determinación de carbohidratos

- ❖ Se emplea el método colorimétrico de Dreywood (1946). Basado en la cuantificación de la glucosa total utilizando el reactivo de la antrona, empleada en moluscos marinos por Fraga, 1956.

Obtención de la recta de calibrado

Se utiliza un estándar: D (+) glucosa anhidra, en un rango de concentraciones de 15–105 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$



Reactivos empleados

- Ácido sulfúrico (SO_4H_2) 96%
- Antrona ($\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}$)
- Ácido benzoico ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$)
- Hidróxido de potasio (KOH)

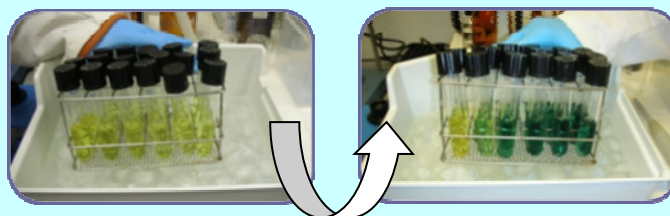
PROCEDIMIENTO

1º Extracción de carbohidratos

- ❖ Las muestras, por duplicado, se someten a hidrólisis con hidróxido potásico 3N. La reacción tiene lugar en un baño a 90°C durante una hora.

2º Reacción colorimétrica

- ❖ Después de la neutralización con ácido sulfúrico, de cada muestra se toman tres alícuotas a las que se les adiciona el reactivo de la antrona y se produce la reacción manteniéndolas en un baño a 90°C.



3º Lectura en espectrofotómetro a una λ de 625 nm

Figura 3.2. Procedimiento para determinación de carbohidratos totales.

Determinación de lípidos totales

- ❖ Para la determinación de lípidos totales se empleó un método gravimétrico, previa extracción de los lípidos por el método de Folch *et al.* (1957).

Reactivos utilizados

- Cloroformo (Cl_3CH) para cromatografía en fase líquida
- Metanol (MeOH) químicamente puro
- Cloruro sódico (NaCl)

PROCEDIMIENTO

1º Extracción de lípidos

- ❖ A las muestras, por duplicado, se les extrajeron los lípidos con 3 lavados de cloroformo metanol (2:1, v/v).
- ❖ Se sometió la mezcla a centrifugación, separando así los lípidos del tejido que quedaron en la parte inferior.

2º Eliminación del agua y lavado de los componentes no lipídicos

- ❖ El sobrenadante con los lípidos, fue trasvasado a embudos de decantación a los que se les añadió una solución salina (cloruro sódico 0,6N).
- ❖ Después de agitar la mezcla y dejar decantar, los lípidos se recogieron repitiendo el proceso dos veces.

3º Cuantificación gravimétrica

- ❖ Una vez evaporados en estufa, los lípidos fueron redissueltos en un volumen conocido de cloroformo.
- ❖ Se tomaron tres alícuotas en cápsulas previamente taradas y después de ser evaporadas en estufa, fueron nuevamente pesadas para hallar los lípidos totales.



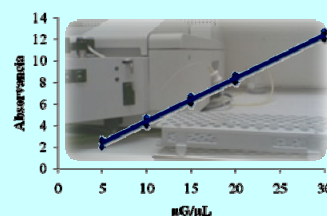
Figura 3.3. Esquema del procedimiento para determinación de lípidos totales.

Determinación de proteínas totales

- ❖ El análisis de proteínas se realizó a partir del método modificado de Lowry *et al.* (1951), basado en los resultados de Bensadoun y Weinstein (1976) y Hess *et al.* (1978).

Obtención de la recta de calibrado

La recta de calibrado se realizó utilizando como estándar la seroalbúmina bovina en un rango de concentraciones de 5 a 30 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$



Reactivos utilizados

REACTIVO I

- ❖ 25 volúmenes NaOH 0,8 M
- ❖ 18 volúmenes de reactivo A

Reactivo A

0,2 g tartrato disódico
10 g carbonato sódico
69 mL NaOH 0,8 M
Enrasar a 100 mL de agua Milli-Q

- ❖ 2 volúmenes de reactivo B

Reactivo B

2 g tartrato disódico
1 g sulfato de cobre (II)
12,5 mL NaOH 0,8 M
Enrasar a 100 mL de agua Milli-Q

REACTIVO II

- ❖ 1 volumen reactivo del fenol (Folin- Ciocalteu)
- ❖ 2 volúmenes agua Milli-Q



Reactivo I

Reactivo II

PROCEDIMIENTO

1º Extracción de proteínas

- ❖ La digestión se llevó a cabo con hidróxido sódico NaOH 2,5 N, manteniendo las muestras (por duplicado) en un baño a 56°C durante 30 minutos.

2º Reacción colorimétrica

- ❖ Se tomaron tres alícuotas de cada muestra en viales eppendorf, a las que se les añadieron los reactivos I y II. Después de agitar, para su incubación se mantuvieron en oscuridad durante 45 minutos.

3º Lectura en espectrofotómetro a una λ de 750 nm

Figura 3.4. Esquema del procedimiento para determinación de proteínas totales.

3.2.5. Determinación de cenizas

En cápsulas de aluminio previamente pasadas al horno a 500°C, se pesaron 5 mg de tejido previamente liofilizado. Las cápsulas se introdujeron en la mufla, subiendo la temperatura de un modo gradual, hasta llegar a los 500°C durante 2 horas y media.

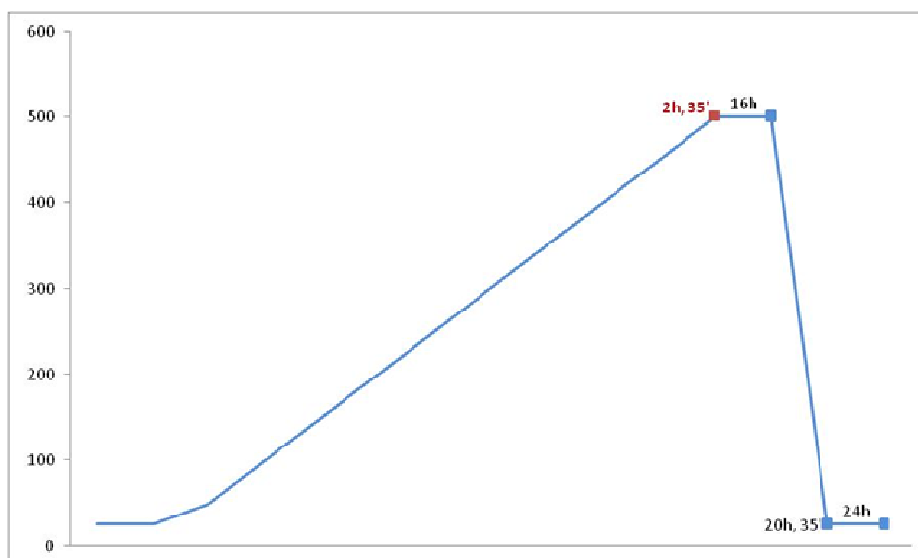


Figura 3.5. Curva de temperaturas del método de determinación de cenizas.

El incremento de temperatura ha de ser progresivo para evitar una proyección de la muestra. Las muestras se pusieron 16 horas en la mufla, pasado este tiempo se dejaron enfriar en su interior. Grove *et al.* (1961) recomiendan no superar los 550°C ni las 24 horas para evitar pérdidas de Na y K. Cuando la temperatura en el interior de la mufla fue inferior a 100°C, se trasladaron las muestras a un desecador durante una hora. A continuación se pesaron las cenizas en una balanza de precisión Sartorius MC 210S (D.E.=0,01 mg).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Ciclo gametogénico de la coquina

En base a los análisis histológicos realizados, se hace una descripción de las observaciones microscópicas designando y caracterizando los estadios que componen el ciclo gametogénico de *D. trunculus*.

E0. Reposo sexual

En este estadio, a nivel macroscópico, la gónada carece de coloración y su tamaño es muy reducido. A nivel microscópico, no se puede hacer una diferenciación entre machos y hembras ya que no se observa ningún folículo en la gónada. Esta aparece ocupada por tejido conectivo con gran cantidad de hemocitos (Figura 3.6). Estas estructuras están rodeadas por haces de tejido muscular muy abundante en este estadio.

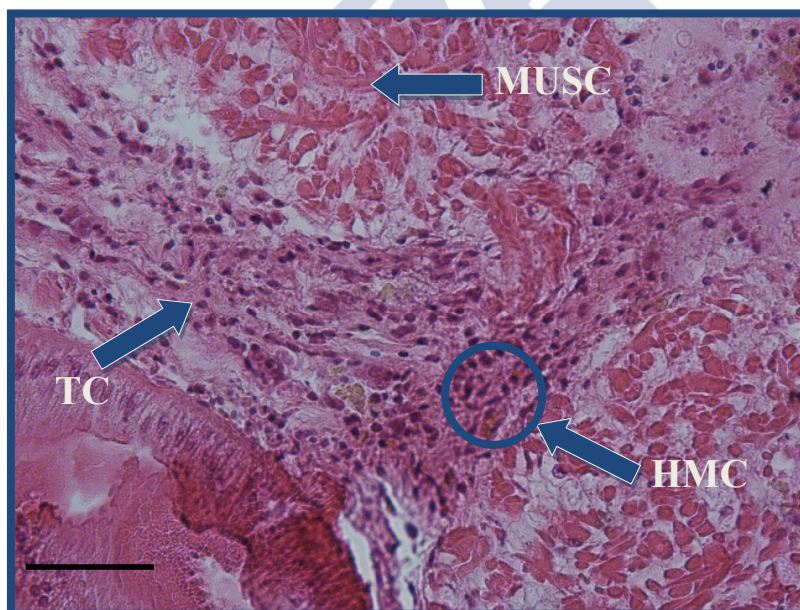


Figura 3.6. Corte histológico de la coquina en estadio E0. Se observan, tejido conectivo (TC), hemocitos (HMC) y músculo (MUSC). Barra de escala 50 μ m.

Al final del período de reposo, comienza a verse la formación de folículos entre espacios antes ocupados por tejido conectivo y hemocitos (Figura 3.7).

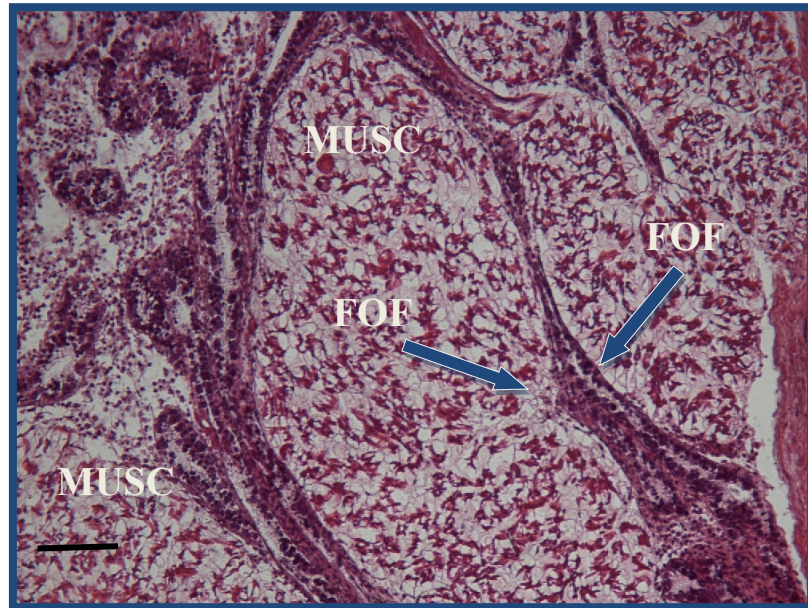


Figura 3.7. Corte histológico de la coquina. Comienzo del estadio E1. Se observan folículos en formación (FOF) rodeados por músculo (MUSC). Barra de escala 200 μ m.

E1. Inicio del desarrollo gametogénico

Macroscópicamente el sexo no es diferenciable ya que las gónadas aparecen muy reducidas y sin coloración, pero en las preparaciones histológicas sí se diferencia el sexo. En el estadio de inicio de desarrollo gametogénico se ven folículos formados, rodeados por una fina capa de tejido conectivo, las gonias se encuentran adheridas a sus paredes, y las células vesiculares ocupan la mayor parte del folículo (Fig. 3.8). En ocasiones, en el lumen del folículo, se observan ovogonias y ovocitos previtelogénicos de muy reciente formación en hembras (Fig. 3.9) y espermatogonias y espermatocitos primarios en machos (Fig. 3.10). La ocupación folicular es incipiente, todavía se observa tejido muscular y existe presencia hemocitaria en el tejido gonadal.

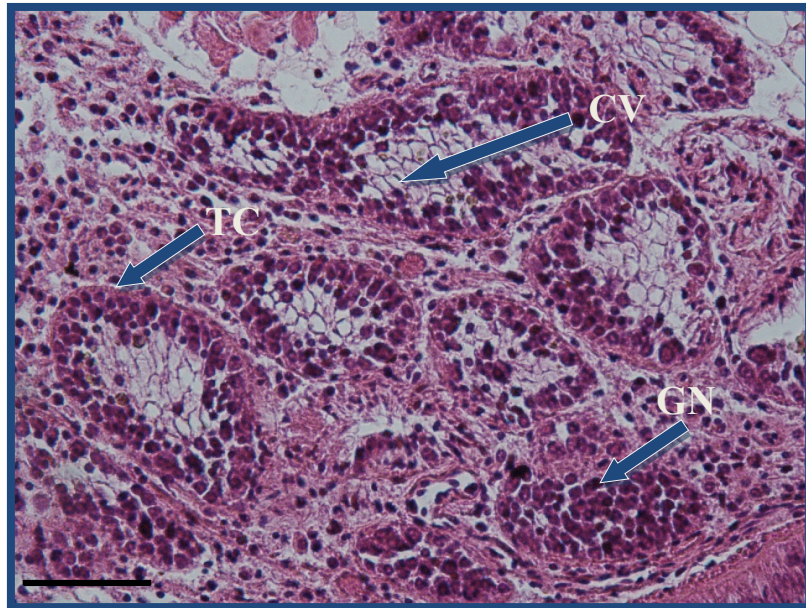


Figura 3.8. Coquina en estadio E1. Sexo sin diferenciar. Se distinguen los folículos rodeados por tejido conectivo (TC) con células vesiculares (CV) y gonias (GN) adheridas a las paredes. Barra de escala 50 μm .

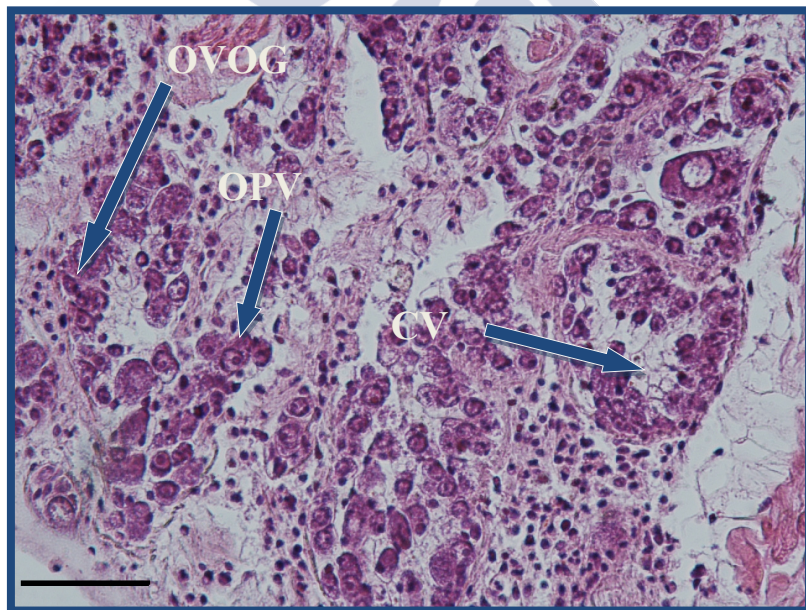


Figura 3.9. Corte histológico de una gónada hembra de coquina en estadio E1. Se observan folículos con células vesiculares (CV), ovogonias (OVOG) y los primeros ovocitos previtelogénicos (OPV). Barra de escala 50 μm .

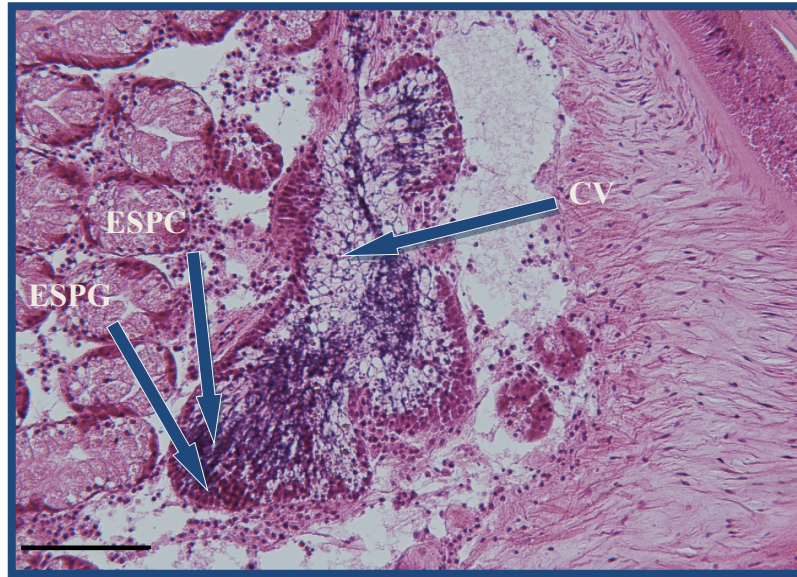


Figura 3.10. Corte histológico de gónada macho de coquina en estadio E1. Se diferencian las spermatogonias (ESPG) y algún espermatocito primario (ESPC). Barra de escala 100 μ m.

E2. Gametogénesis avanzada

Macroscopicamente ya se puede diferenciar el sexo por la coloración de la gónada, violeta en las hembras y blanca en los machos o apreciándose a la vez, el incremento en el tamaño de la misma.

Los folículos aumentan de tamaño y ocupan gran parte de la gónada. El incremento en el tamaño de los ovocitos que se encuentran en proceso de maduración provoca un aumento del volumen total del folículo, y en consecuencia, la gónada aparece ocupada en su mayor parte por tejido folicular observándose una reducción de las células vesiculares. En las hembras (Fig. 3.11, A y B), se aprecian ovocitos maduros acompañados de líneas germinales más tempranas, ovocitos primarios o previtelogénicos, que aún no han salido de la pared del folículo y ovocitos pedunculados. A medida que avanza el estadio, aumenta el número y tamaño de ovocitos, por lo que el tamaño del folículo sigue incrementándose. La proporción de ovocitos maduros irá creciendo a medida que avanza la maduración.

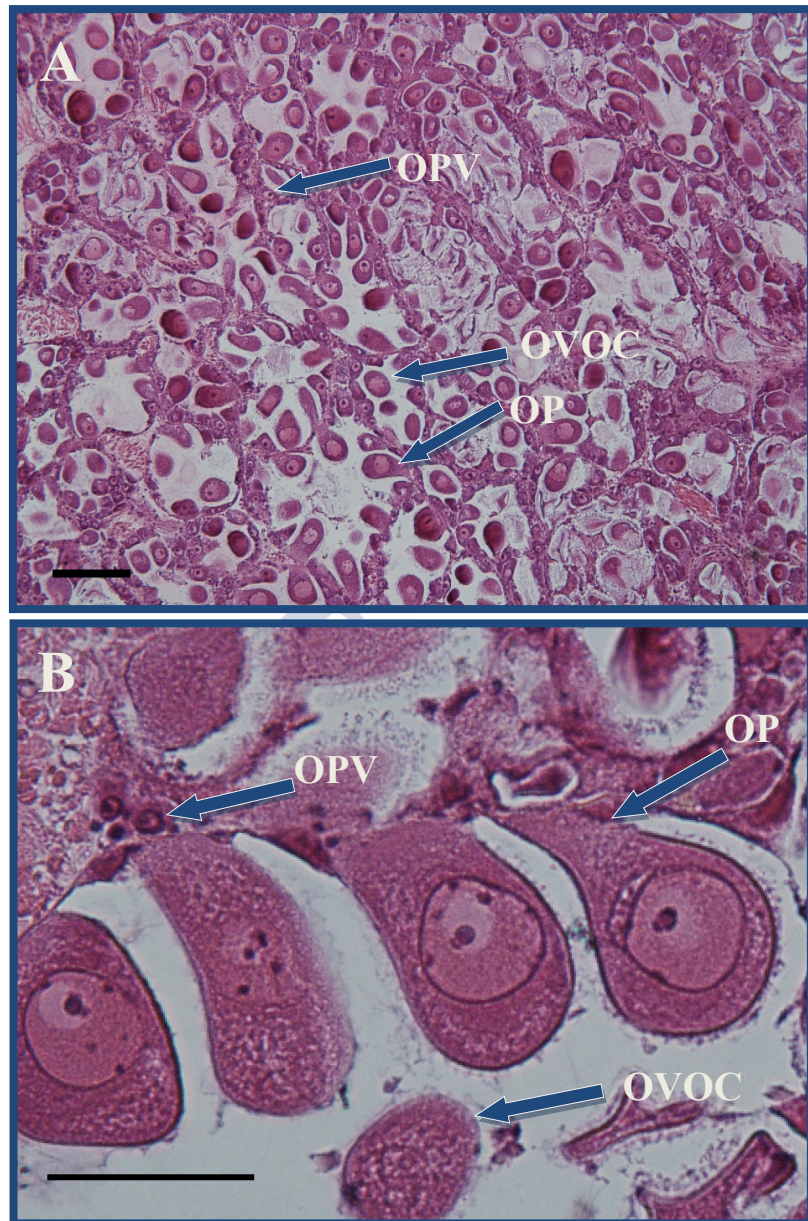


Figura 3.11 (A-B). Hembra en gametogénesis avanzada. Líneas germinales femeninas tempranas, ovocitos previtelogénicos o primarios (OPV), ovocitos pedunculados (OP) y aparición de los primeros ovocitos maduros (OVOC). Barra de escala 100 μm (Figura A). Barra de escala 50 μm (Figura B).

3. Ciclo gametogénico

En la gónada masculina en gametogénesis avanzada, los folículos ocupan una gran parte del tejido gonadal y presentan ya espermatozoides maduros en el lumen. Al mismo tiempo, existen bandas centrípetas de líneas germinales tempranas por desarrollar (Fig. 3.12).

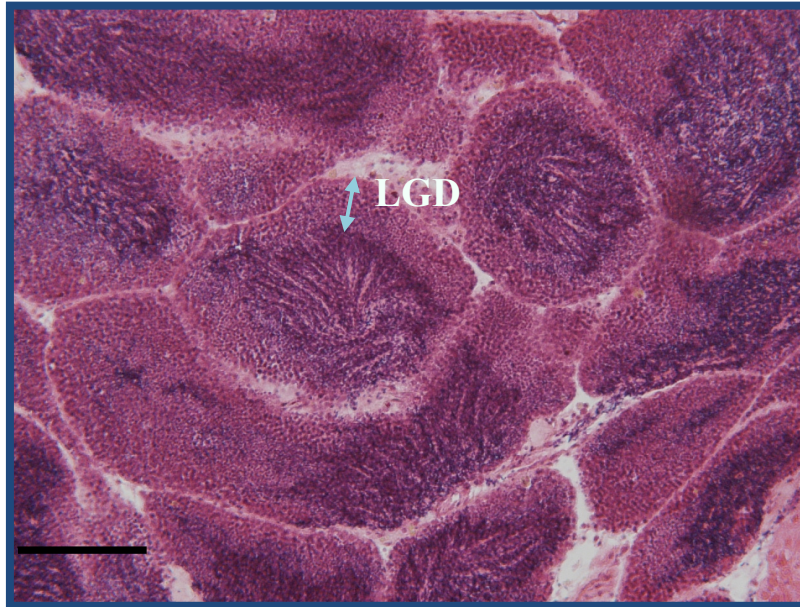


Figura 3.12. Gónada macho en gametogénesis avanzada. Folículos masculinos con líneas germinales en desarrollo en su cara externa (LGD). Barra de escala 100 µm.

En los machos, es característica durante el estadio de gametogénesis avanzada, la coexistencia de células correspondientes a varias fases de la espermatogénesis. Las líneas germinales más tempranas se localizan próximas a la pared del folículo, el desarrollo de las siguientes se produce de una forma centrípeto hacia el lumen del folículo. (Figura 3.13). De la parte más externa del folículo hacia el interior se observan: espermatogonias que sufrirán mitosis para dar lugar a espermatocitos primarios. Los espermatocitos secundarios, se originan a partir de una meiosis de los primarios. Los espermatocitos secundarios, por división, dan lugar a las espermátidas, que sufren una compleja diferenciación, dando lugar al espermatozoide maduro.

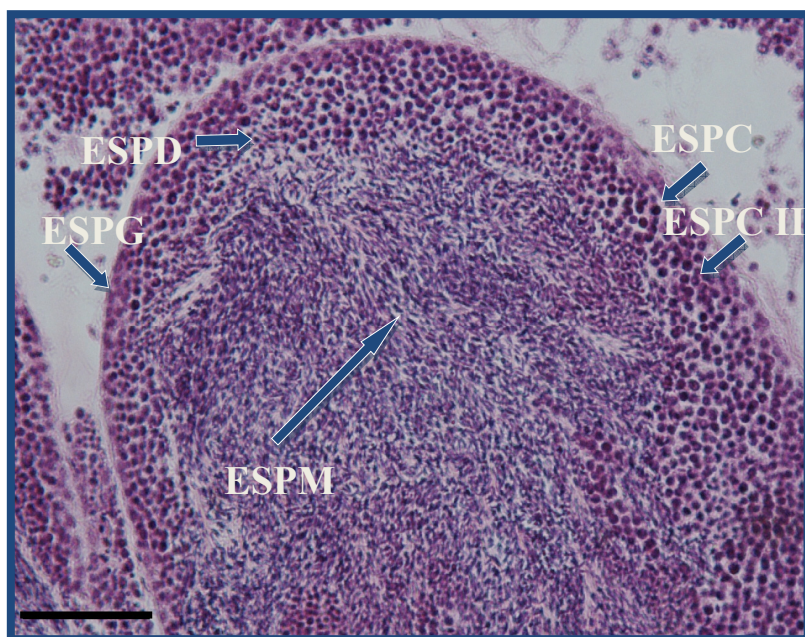


Figura 3.13. Gónada macho en gametogénesis avanzada. Folículo con espermatogonias (ESPG) en su cara más externa, espermatocitos primarios (ESPC), secundarios (ESPC II), espermátidas (ESPD) y espermatozoides maduros en el lumen (ESPM). Barra de escala 50 μ m.

E3. Madurez y puesta

En la etapa de madurez claramente a nivel macroscópico, se diferencia el sexo por la coloración de la gónada, violeta en hembras y blanquecina en machos, además tiene lugar un incremento del tamaño de la misma y la gónada se encuentra en su máximo grado de desarrollo con un aspecto muy turgente. En este período, mediante estudio con frotis al microscopio óptico, se ven en los folículos de las hembras ovocitos y en el lumen de los machos, espermatozoides maduros.

En el estadio E3, no existen células vesiculares en el folículo. En la gónada femenina (Figura 3.14), los ovocitos totalmente maduros, se encuentran libres en el lumen despegados de la pared folicular, aunque puede encontrarse en este estadio algún ovocito pedunculado a punto de desprenderse e incluso, algún ovocito primario o previtelogénico en la pared del folículo.



Figura 3.14. Gónada hembra madura. Se observan ovocitos maduros (OVOC), pedunculados (OP) y algún ovocito primario o previtelogénico (OPV). Barra de escala 50 μ m.

En los machos (Figura 3.15 A y B), la gónada aparece también ocupada en su totalidad por folículos. Cada uno aparece lleno de espermatozoides maduros, pudiendo quedar en la zona más externa del folículo, dos líneas germinales que se desarrollarán dando lugar a espermatozoides.

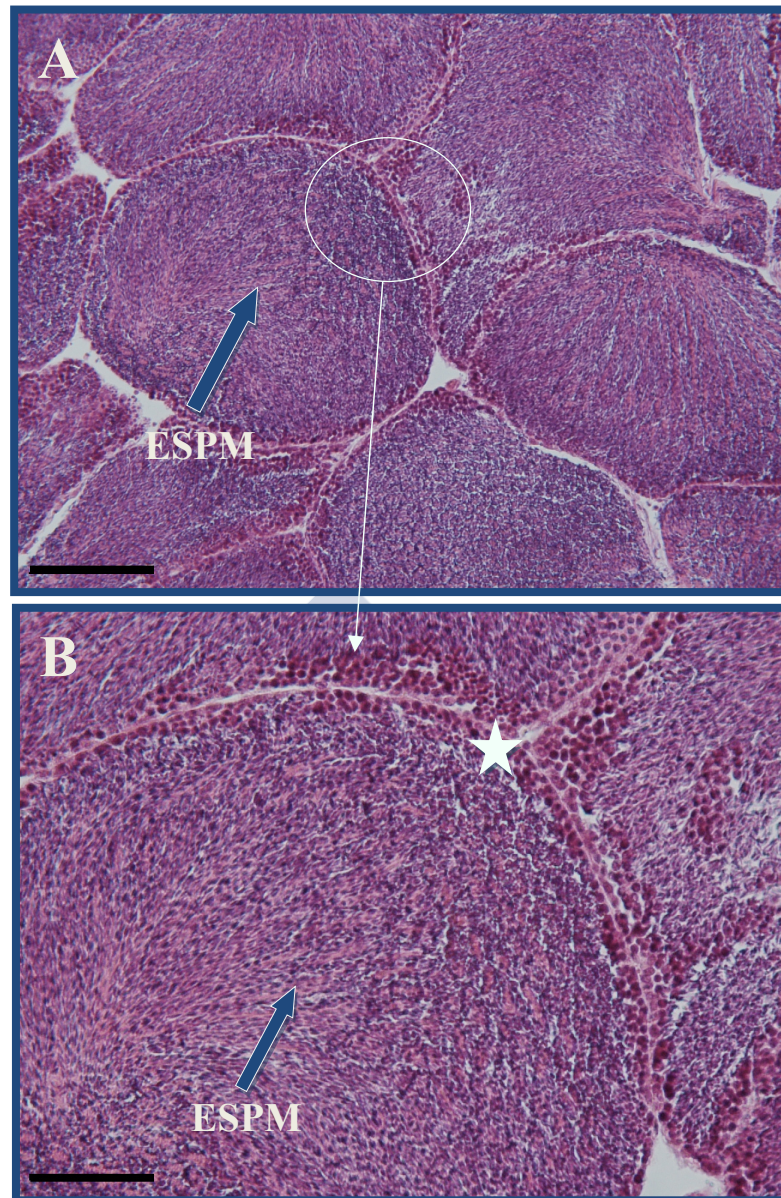


Figura 3.15. (A-B). A) Gónada macho en estado de madurez con folículos llenos de espermatozoides maduros (ESPM). Barra de escala 100 μm . B) Detalle del extremo externo de folículo masculino en madurez con sólo dos líneas germinales tempranas señaladas con una estrella. Barra de escala 50 μm .

E4. Postpuesta

Este estadio resulta del vaciado gonadal tras la puesta. Los folículos están en regresión. En las hembras (Figura 3.16), se ven ovocitos residuales, con una alta presencia hemocitaria alrededor. En las gónadas masculinas (Figura 3.17), también se observan los folículos en regresión con espermatozoides residuales, dispersos incluso por el exterior del folículo. La proliferación de tejido conectivo y la elevada presencia de hemocitos, caracterizan este estadio.

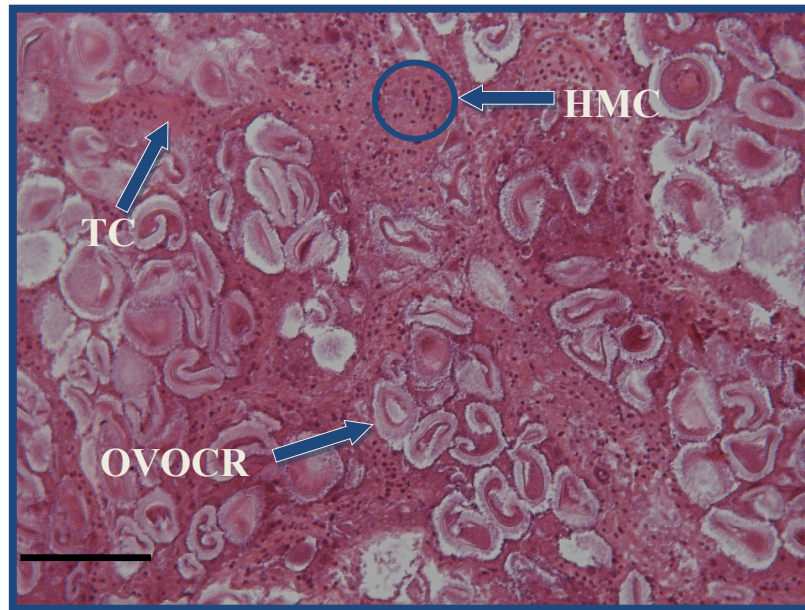


Figura 3.16. Gónada hembra en postpuesta. Se observa proliferación de tejido conectivo (TC), de hemocitos (HMC) y ovocitos residuales (OVOCR). Barra de escala 100 μ m.

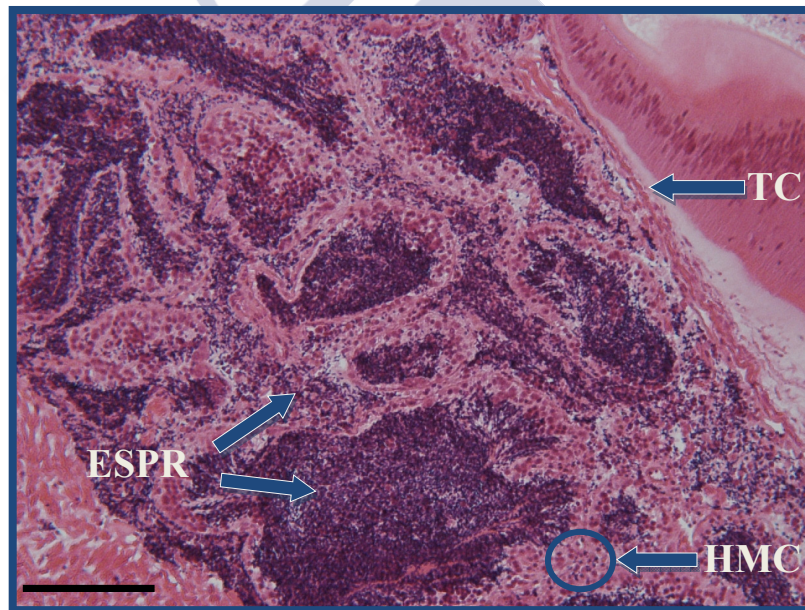


Figura 3.17. Gónada macho tras el vaciado gonadal, se observan espermatozoides residuales (ESPR), proliferación de tejido conectivo (TC) y hemocitos (HMC). Barra de escala 100 μ m.

3.3.1.1. Variación de los estadios del ciclo gametogénico

En la gónada de la coquina siempre aparecen folículos en diferentes estadios de desarrollo por lo que, para realizar la asignación de un estadio a un determinado individuo, se toma como criterio de selección aquel que aparece de una forma mayoritaria.

La coquina presentó un corto período de reposo que suele comenzar en septiembre y se mantiene hasta noviembre-diciembre.

Durante el primer año de estudio, en noviembre y diciembre, la mayor parte de los individuos muestreados se encontraban en el estadio E1, de inicio del desarrollo gametogénico. En diciembre se observó un máximo (97%) de los individuos en este estadio (Figura 3.18). Una pequeña parte se encuentra en estadio de reposo (E0), 13% en noviembre y sólo un 2% en diciembre. En enero, apareció el estadio E2, aumentando en febrero hasta un 33% de individuos.

El período de madurez y puesta se extendió de marzo a agosto con un 73% de individuos en estadio E3 en el mes de julio (Figura 3.18).

En el mes de agosto, comenzó a observarse gónadas vacías y de muy pequeño tamaño a nivel macroscópico. Se observaron gametos residuales resultado de la puesta con un 73% de individuos en estadio E4 de postpuesta. El estadio de reposo apareció en el mes de septiembre, no se observaron folículos en la mayor parte de los individuos, pero en algunos se diferenció el sexo como resultado de la presencia de gametos residuales. En esta etapa coexistían en la misma gónada el estadio E0 y el E4 con una pequeña proporción de individuos que ya estaban comenzando el desarrollo gametogénico E1, estadio que aumentó en proporción hasta el mes de diciembre.

La evolución del ciclo gametogénico de la coquina fue similar a lo largo de los dos años de estudio, adelantándose un poco en el segundo.



Figura 3.18. Representación de los diferentes estadios de las gónadas de coquina a lo largo de los meses de estudio.

3.3.2. Datos biométricos, pesos secos e índice de condición

En la tabla III.1, se muestran los datos biométricos medios mensuales de la población de la coquina estudiada. La longitud de los individuos muestreados fue superior a la talla comercial (37,8-42,3 mm). Los pesos totales y de la concha presentan máximos de 10,6 g y 7,4 g, respectivamente en junio del 2007 y mínimos en octubre del 2008 (7,3 g y 4,8 g). El peso fresco de la carne representa, aproximadamente, el 19% del peso total del individuo, siendo muy superior al peso de la concha.

Tabla III.1. Datos biométricos medios mensuales de la población de la coquina estudiada. Se expresan, media \pm desviación típica.

FECHA	MEDIDAS (mm)		PESO FRESCO (g)			PESO SECO (g)	
	Longitud	Altura	Total	Concha	Carne	Concha	Carne
nov-06	39,0 \pm 2,41	20,8 \pm 1,08	7,9 \pm 2,08	5,4 \pm 1,68	1,6 \pm 0,30	5,2 \pm 1,64	0,4 \pm 0,07
dic-06	40,4 \pm 2,04	21,7 \pm 1,06	8,6 \pm 1,93	6,1 \pm 1,54	1,6 \pm 0,26	5,9 \pm 1,50	0,4 \pm 0,05
ene-07	40,2 \pm 1,60	21,2 \pm 3,65	9,3 \pm 1,25	6,3 \pm 1,04	1,6 \pm 0,3	5,9 \pm 1,41	0,3 \pm 0,07
feb-07	40,9 \pm 2,39	22,1 \pm 1,22	10,2 \pm 2,32	7,2 \pm 1,93	1,6 \pm 0,25	6,9 \pm 1,89	0,3 \pm 0,05
mar-07	39,2 \pm 2,41	21,2 \pm 1,14	8,3 \pm 1,51	6,2 \pm 3,07	1,5 \pm 0,29	5,5 \pm 1,14	0,3 \pm 0,06
abr-07	42,1 \pm 2,1	22,4 \pm 1,23	7,8 \pm 2,24	5,4 \pm 1,71	1,5 \pm 0,31	5,2 \pm 1,66	0,3 \pm 0,07
may-07	39,8 \pm 1,94	21,5 \pm 1,19	8,9 \pm 1,78	6,2 \pm 1,53	1,7 \pm 0,28	6,0 \pm 1,46	0,3 \pm 0,05
jun-07	42,3 \pm 1,66	22,6 \pm 0,95	10,6 \pm 1,72	7,4 \pm 1,44	1,6 \pm 0,23	7,2 \pm 1,42	0,4 \pm 0,07
jul-07	38,9 \pm 2,12	20,9 \pm 1,22	8,4 \pm 1,63	5,8 \pm 1,25	1,4 \pm 0,23	5,6 \pm 1,20	0,3 \pm 0,05
ago-07	40,2 \pm 2,87	21,6 \pm 1,50	8,8 \pm 1,95	6,1 \pm 1,53	1,3 \pm 0,24	5,9 \pm 1,49	0,2 \pm 0,05
sep-07	40,2 \pm 3,67	21,6 \pm 1,83	8,8 \pm 2,62	6,2 \pm 1,65	1,5 \pm 0,4	5,9 \pm 1,61	0,3 \pm 0,08
oct-07	39,5 \pm 2,07	21,3 \pm 1,09	8,7 \pm 2,05	5,9 \pm 1,62	1,9 \pm 0,28	5,7 \pm 1,58	0,4 \pm 0,06
nov-07	39,8 \pm 2,36	21,2 \pm 1,26	8,5 \pm 2,08	5,8 \pm 1,60	1,8 \pm 0,29	5,5 \pm 1,57	0,43 \pm 0,07
dic-07	38,6 \pm 2,17	21,0 \pm 1,17	7,9 \pm 1,63	5,4 \pm 1,28	1,6 \pm 0,3	5,2 \pm 1,24	0,4 \pm 0,07
ene-08	38,6 \pm 2,43	20,8 \pm 1,24	7,8 \pm 1,76	5,3 \pm 1,37	1,5 \pm 0,32	5,2 \pm 1,34	0,3 \pm 0,08
feb-08	38,6 \pm 2,40	20,81 \pm 1,16	7,8 \pm 1,50	5,3 \pm 1,12	1,6 \pm 0,30	5,1 \pm 1,09	0,3 \pm 0,06
mar-08	38,1 \pm 2,30	20,6 \pm 1,18	7,4 \pm 1,86	4,9 \pm 1,36	1,5 \pm 0,28	4,8 \pm 1,32	0,3 \pm 0,07
abr-08	38,9 \pm 2,25	21,1 \pm 1,13	8,0 \pm 1,96	5,5 \pm 1,23	1,4 \pm 0,29	5,3 \pm 1,20	0,3 \pm 0,06
may-08	38,8 \pm 1,94	20,6 \pm 1,06	7,7 \pm 1,40	5,2 \pm 1,10	1,3 \pm 0,27	5,0 \pm 1,07	0,3 \pm 0,05
jun-08	39,1 \pm 2,45	20,9 \pm 1,36	8,2 \pm 1,91	5,7 \pm 1,46	1,1 \pm 0,22	5,5 \pm 1,40	0,2 \pm 0,04
jul-08	38,2 \pm 2,21	20,6 \pm 1,24	7,4 \pm 1,55	5,1 \pm 1,27	1,1 \pm 1,22	4,9 \pm 1,23	0,2 \pm 0,04
ago-08	39,2 \pm 1,95	18,5 \pm 4,63	8,4 \pm 1,84	5,7 \pm 1,49	1,7 \pm 0,26	5,5 \pm 1,45	0,4 \pm 0,07
sep-08	38,9 \pm 2,24	20,9 \pm 1,19	8,3 \pm 1,73	5,7 \pm 1,35	1,8 \pm 0,31	5,5 \pm 1,32	0,5 \pm 0,08
oct-08	37,8 \pm 2,43	20,3 \pm 1,32	7,3 \pm 1,78	4,8 \pm 1,33	1,8 \pm 0,40	4,7 \pm 1,31	0,4 \pm 0,10
nov-08	38,6 \pm 2,46	20,7 \pm 1,34	8,1 \pm 2,04	5,4 \pm 1,57	1,8 \pm 0,38	5,3 \pm 1,54	0,5 \pm 0,12
dic-08	38,3 \pm 2,56	20,6 \pm 1,36	7,4 \pm 1,82	5,0 \pm 1,35	1,8 \pm 0,43	4,9 \pm 1,32	0,4 \pm 0,11

3. Ciclo gametogénico

El índice de condición obtenido se representa en la figura 3.19. En la primera anualidad (2007), el índice de condición más bajo 22,6%, se observa durante el mes de agosto. En el segundo año de estudio (2008), este mínimo se observa en el mes de junio con 21,7%.

Los valores mas altos se observaron en el mes de noviembre tanto en el año 2006 como 2007 (41% y 34,6%, respectivamente). En octubre de 2008, se alcanzó el máximo de 41,5%.

El índice de condición responde a una variación estacional, presentando sus valores más bajos en los meses de primavera-verano y, en otoño e invierno, son más altos.

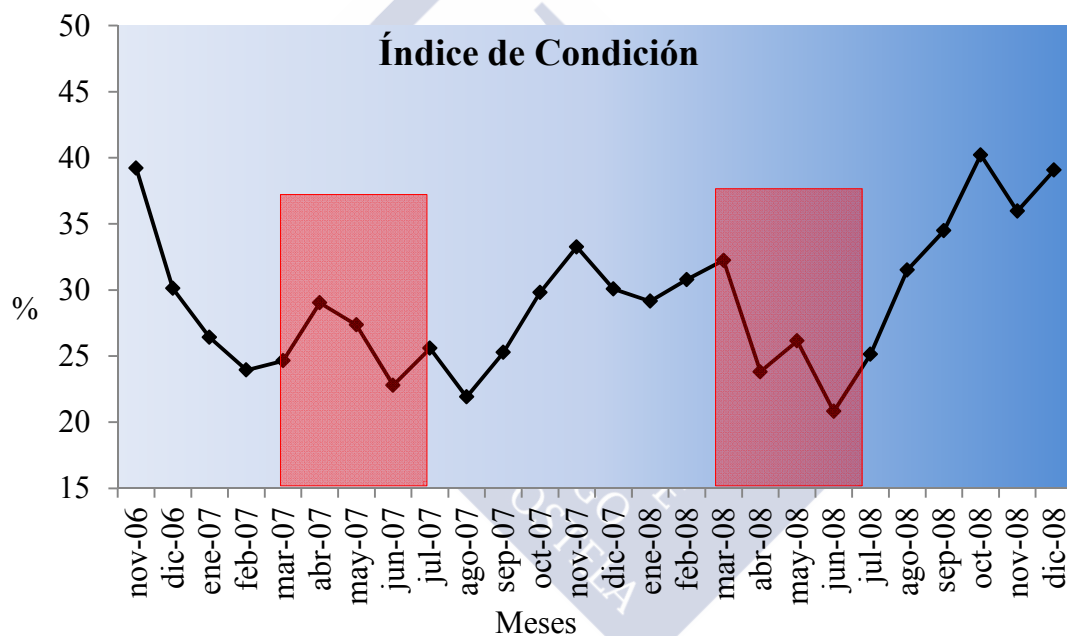


Figura 3.19. Representación del índice de condición ((Peso fresco carne/Peso fresco concha)*100) de *D. trunculus*, en el banco estudiado.

3.3.3. Bioquímica asociada al ciclo reproductivo

El análisis en composición bioquímica de carbohidratos, lípidos y proteínas se realizó en machos, hembras e individuos con sexo sin diferenciar, analizando por separado la gónada y la víscera del individuo.

Debido a que por un lado, no en todos los meses aparecen individuos machos, hembras e indeterminados y, por otro, después de analizarlos separadamente se observó que los datos de los tres tipos de individuos eran similares, decidimos representarlos todos juntos y así poder ver la evolución mensual de la gónada y la víscera, a lo largo de todo el ciclo gametogénico.

3.3.3.1. Composición en carbohidratos

En la figura 3.20 se representa la evolución de los carbohidratos tanto en la gónada como en la víscera, a lo largo del estudio del ciclo gametogénico de la coquina. Las dos partes del animal tienen una evolución muy similar en este compuesto aunque, en casi todos los meses, su cantidad es mayor en la gónada que en la víscera.

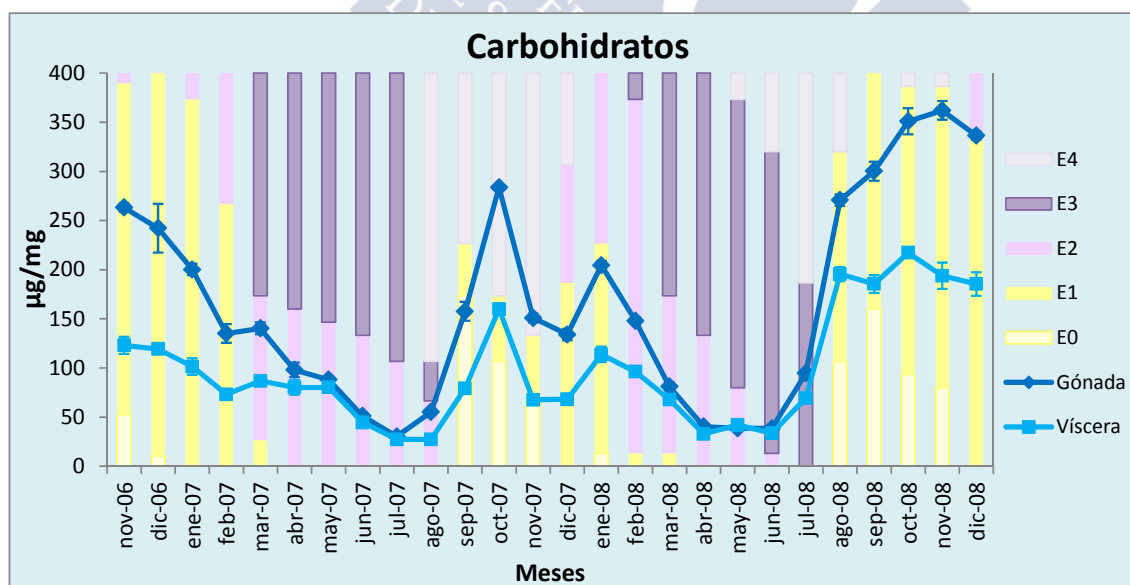


Figura 3.20. Representación gráfica de la evolución en la cantidad de carbohidratos en µg/mg de peso seco en la gónada y en la víscera de la coquina y de los estadios de su ciclo gametogénico.

Los valores fueron bajos en primavera-verano, coincidiendo con el mayor porcentaje de individuos en estadio E3 de madurez y puesta y aumentaron, en otoño

3. Ciclo gametogénico

invierno, coincidiendo con los estadios E4 de postpuesta y E0 de reposo. Se obtuvieron mínimos en julio de 2007 (30,4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ en gónada y 27,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ en víscera) y en junio de 2008 (38,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ en gónada y 33,7 $\mu\text{g}/\text{mg}$ en víscera). Los máximos fueron en octubre de 2007 (283,8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ en gónada y 160,03 $\mu\text{g}/\text{mg}$ en víscera) y noviembre-octubre de 2008 (362,01 $\mu\text{g}/\text{mg}$ en gónada y 217,2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ en víscera).

3.3.3.2. Composición en lípidos

La figura 3.21 muestra la evolución de los lípidos en la gónada y víscera de la coquina a lo largo de los dos años de estudio. Este compuesto no presentó el mismo perfil de evolución en estas dos partes analizadas, siendo la víscera la que menor contenido y la que menor variación presentó. La gónada, por el contrario, sí presenta más variabilidad a lo largo de los meses.

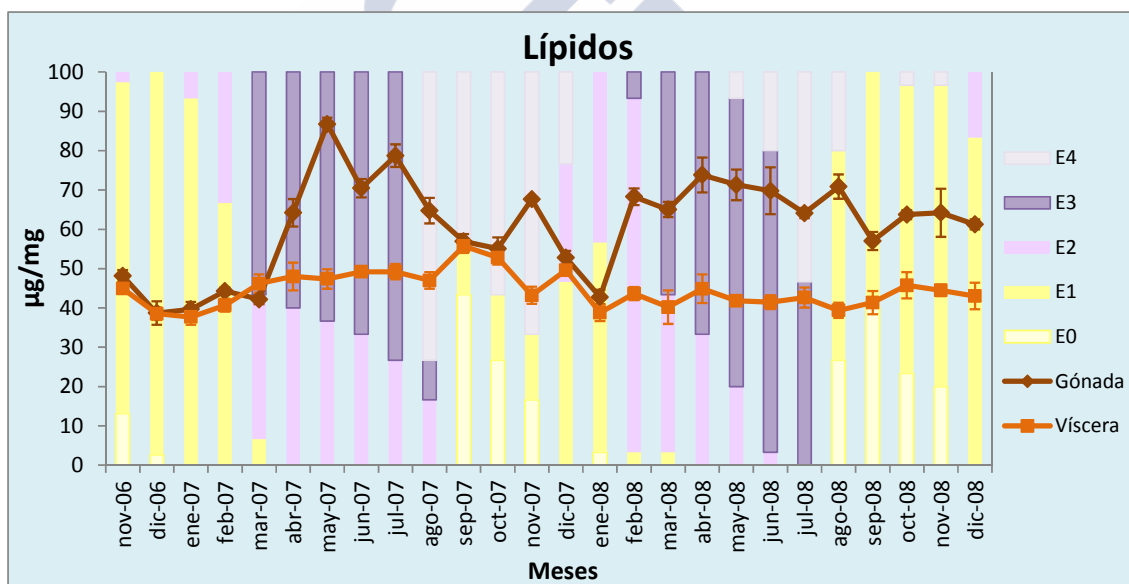


Figura 3.21. Representación gráfica de la evolución en la cantidad de lípidos en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco en la gónada y en la víscera de la coquina y de los estadios de su ciclo gametogénico.

La víscera presenta valores mínimos de 37,7 y 38,8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de contenido lipídico y máximos de 55,72 $\mu\text{g}/\text{mg}$. La gónada, en cambio, presentó máximos y mínimos contrarios a los encontrados en la composición de carbohidratos. Presenta los valores más altos en mayo-julio del 2007 (86,8-70,5-78,1 $\mu\text{g}/\text{mg}$) y abril-junio del 2008 (73,8-71,3-69,8 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Las cantidades más bajas, coinciden con el reposo gonadal y los máximos de carbohidratos, siendo en el mes de enero de los dos años estudiados y con valores de 39,7 y 42,7 $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectivamente.

3.3.3.3. Composición en proteínas

La evolución de la composición en proteínas a lo largo de los dos años estudiados se muestra en la figura 3.22. Según los resultados, la víscera de coquina presentó mayor contenido proteico que la gónada y, en ambos casos, sus evoluciones no tenían relación con el ciclo gametogénico, ni tampoco, con los otros dos compuestos bioquímicos.

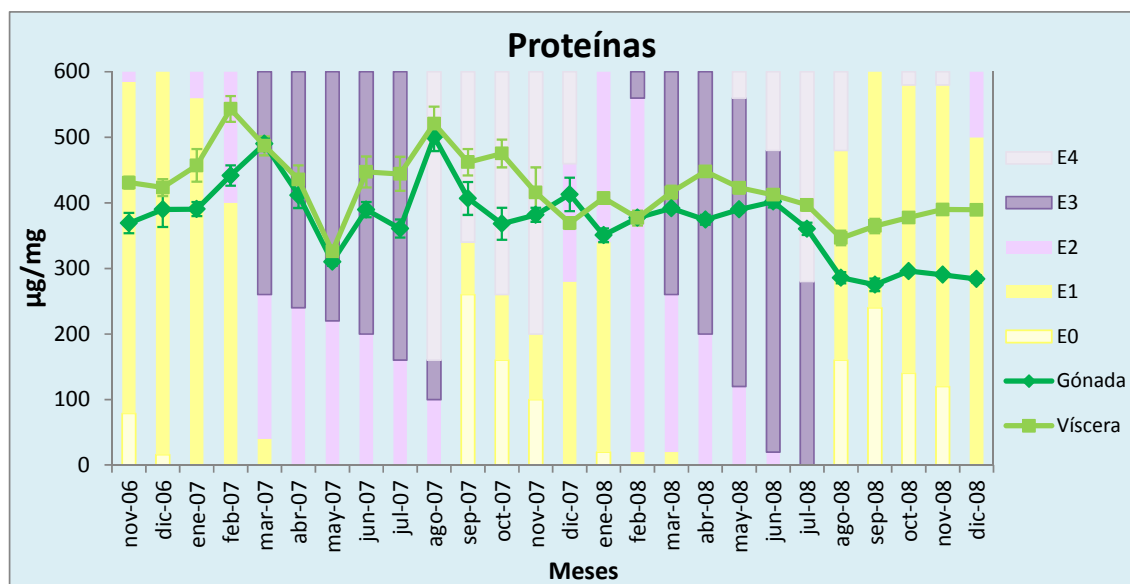


Figura 3.22. Representación gráfica de la evolución en la cantidad de proteínas en $\mu\text{g/mg}$ de peso seco en la gónada y en la víscera de la coquina y de los estadios de su ciclo gametogénico.

La víscera presentó valores máximos en febrero y agosto de 2007 (543,4 y 520,9 $\mu\text{g/mg}$, respectivamente) y en abril de 2008 (447,9 $\mu\text{g/mg}$); la gónada los presentó en marzo y agosto de 2007 (486,9 y 500,8 $\mu\text{g/mg}$, respectivamente) y en junio de 2008 (412,4 $\mu\text{g/mg}$). Los mínimos de la víscera se encontraron en mayo de 2007 y agosto de 2008 (325,9 y 346,4 $\mu\text{g/mg}$, respectivamente); los de la gónada en mayo de 2007 y septiembre de 2008 (310,1 y 275,1 $\mu\text{g/mg}$, respectivamente).

3.3.4. Contenido en cenizas

La evolución de las cenizas de la víscera y gónada de la coquina, en los meses estudiados, se muestra en la figura 3.23. La víscera de esta especie tiene mayor cantidad de cenizas y su perfil de evolución, presenta bastante paralelismo con el contenido de cenizas en la gónada.

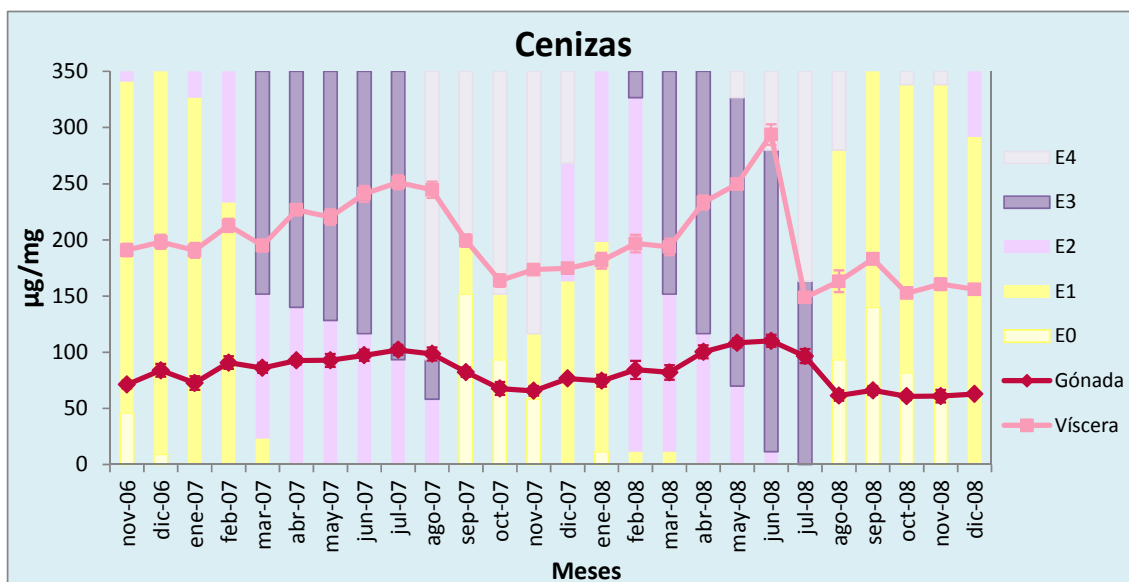


Figura 3.23. Representación gráfica de la evolución en la cantidad de cenizas en $\mu\text{g/mg}$ de peso seco en la gónada y en la víscera de la coquina y de los estadios de su ciclo gametogénico.

El contenido en cenizas en la gónada y víscera de la coquina, parece estar relacionado con el ciclo gametogénico de la especie, con máximos durante el período de madurez y puesta y mínimos en la etapa de postpuesta y reposo. Los valores más altos en la víscera fueron en julio de 2007 y junio de 2008 (251,3 y 293,8 $\mu\text{g/mg}$); los de la gónada fueron en julio de 2007 y junio de 2008 (102,2 y 110,15 $\mu\text{g/mg}$). Las cantidades de cenizas en víscera más bajas fueron en octubre de 2007 y octubre de 2008 (163,8 y 152,6 $\mu\text{g/mg}$) y en la gónada fueron en noviembre de 2007 y noviembre de 2008 (65,7 y 60,9 $\mu\text{g/mg}$).

3.3.5. Evolución de la composición bioquímica en relación con el ciclo gametogénico

En este apartado se relaciona la evolución del contenido en carbohidratos, lípidos y proteínas totales de un individuo completo con el ciclo gametogénico a lo largo de los meses en los que se realizó el estudio.

En la figura 3.24, se representan de forma gráfica, los estadios de maduración gonadal de la especie y la variación en composición bioquímica mayoritaria (carbohidratos, lípidos y proteínas) en $\mu\text{g}/\text{mg}$, acompañados del índice de condición total en los dos años de estudio.

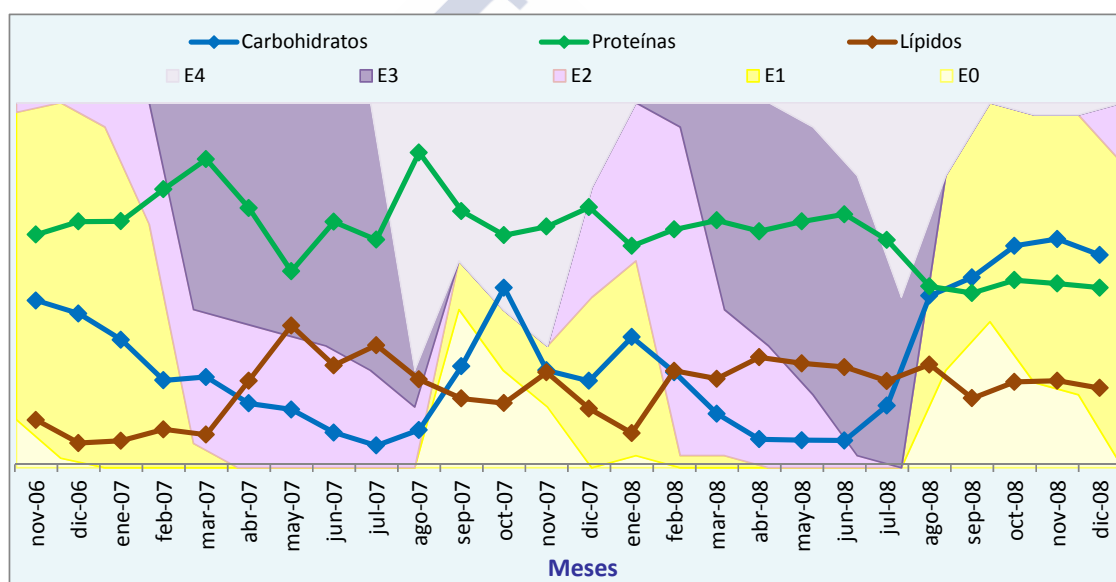


Figura 3.24. Evolución del contenido en carbohidratos, lípidos y proteínas en la gónada de la coquina en relación a su ciclo gametogénico.

Según los datos obtenidos se observa que, el componente bioquímico mayoritario en individuos adultos de coquina lo constituyen las proteínas, le siguen los carbohidratos y los lípidos resultan el componente que aparece en menor proporción.

La evolución de las proteínas mantiene un patrón no demasiado variable a lo largo de los meses de estudio y no se relaciona de un modo directo con el ciclo (Fig. 3.24).

3. Ciclo gametogénico

En cuanto a los carbohidratos, su evolución está inversamente relacionada con el desarrollo gonadal (Fig. 3.24). De modo que, existen mínimos coincidiendo con los meses donde el porcentaje de individuos en E3 (madurez y puesta) es más alto, observándose los máximos en períodos de reposo e inicio de la gametogénesis.

El comportamiento general en el componente lipídico, sigue un patrón opuesto al ciclo de los carbohidratos (Fig. 3.25). Se incrementa en el período de madurez, decreciendo en estadios de escaso desarrollo gonadal. La evolución del contenido en lípidos sería por tanto, directamente proporcional al desarrollo del ciclo gametogénico.

Con estos resultados parece que la coquina acumula preferentemente carbohidratos en períodos de inmadurez para ser después empleados en el desarrollo gametogénico. Además se observa que, durante la evolución del ciclo gametogénico, presenta una variación en la composición bioquímica debida principalmente a los cambios producidos en su gónada.

En resumen, a lo largo de la evolución del ciclo gametogénico, los carbohidratos mantienen una relación inversa con el ciclo, disminuyen conforme este avanza. A medida que los carbohidratos disminuyen, el ciclo de los lípidos aumenta, mientras que las proteínas mantienen un patrón de evolución no relacionado con el desarrollo gametogénico. La evolución en la cantidad de carbohidratos y lípidos en la coquina, está claramente relacionada con el ciclo gametogénico. Sin embargo, la evolución en el contenido proteico mantiene un patrón no demasiado variable a lo largo de los dos años de estudio.

3.4. DISCUSIÓN

La coquina, *Donax trunculus*, presenta sexos separados. En períodos de madurez, la gónada ocupa gran parte del individuo diferenciándose el sexo por la coloración de la misma, siendo violácea en hembras y blanquecina en machos (Louzan-Pérez, 2008). Macroscópicamente, las diferencias en la coloración de esta estructura para la misma especie, son evidenciadas por Moñeza y Frenkiel (1973) en las costas de Argel y Bayed (1990) en las costas de Marruecos. En otras especies de la familia Donacidae como *D. vittatus* (da Costa, 1778) y *D. semistriatus* Poli, 1795, en períodos de madurez, el sexo es también diferenciable a nivel macroscópico, observándose la glándula genital masculina en color blanco y la femenina en tono rojizo (Moñeza y Frenkiel, 1973).

En otras especies de bivalvos marinos, cuando los gametos están maduros, la gónada también adquiere una coloración diferente dependiendo del sexo de los individuos, como en el caso de *Solen marginatus* en el que la gónada femenina presenta una tonalidad marrón y la masculina aparece de color blanco en esta etapa (Martínez, 2002).

La reproducción en los moluscos bivalvos está sujeta a ciclos estacionales, lo que hace disponer de gametos viables durante un período de tiempo determinado. La coquina se caracteriza por tener un período de madurez y puesta que va del mes de marzo en adelante, finalizando hacia el mes de julio. Estudios previos realizados en *D. trunculus* por Badino y Marchioni (1972) y La Valle (2005) en la costa italiana; Fernández Otero (1982) y Martínez *et al.* (1993, 2003) en la Ría de O Barqueiro, al norte de Galicia y Gaspar *et al.* (1999) en las costas de Portugal, sitúan también el período de madurez y puesta en primavera - verano. *D. vittatus* sigue un patrón de ciclo gametogénico paralelo a *D. trunculus* (Ansell, 1972). Sin embargo, en otras especies de la familia Donacidae como *D. serra* Röding, 1798 se han descrito períodos de puesta durante el invierno (Ansell, 1983).

La coquina presenta un corto estadio de reposo (E0) posterior al período de postpuesta (E4) que puede abarcar de septiembre a noviembre, momento en que la

3. Ciclo gametogénico

actividad gonadal es inexistente. En este estadio, no existen folículos en la gónada, esta aparece ocupada por tejido conectivo con gran cantidad de hemocitos que, a su vez, están rodeados por haces de tejido muscular muy abundante en esta etapa. En las coquinas de la costa del Algarve, también se describe el mismo período de reposo sexual, donde la abundancia de tejido conectivo es característica y la presencia de gametos residuales es inexistente (Gaspar, 1996).

En otras especies de moluscos bivalvos como es el caso de los solénidos, *Ensis siliqua* y *S. marginatus* existe también un período de reposo de diferente duración (Martínez, 2002). Sin embargo dentro de la familia Veneridae, la almeja babosa *Venerupis corrugata*, no posee un período de reposo, cuando la gónada deja de producir gametos, se empiezan a formar células vesiculares para comenzar un nuevo ciclo de la gametogénesis (Cerviño-Otero, 2011).

En el estudio de los ciclos reproductivos en moluscos bivalvos, es de utilidad el uso de índices de condición para una primera aproximación sobre la evolución gonadal de los individuos. El índice de condición en la coquina, responde a una variación estacional, presenta sus valores más bajos en los meses de verano y por el contrario, en otoño e invierno, son más altos. Se observa también que sigue un patrón de evolución similar a lo largo de los dos años de estudio. Beukema (1974) hace referencia acerca de que la reducción del peso en los bivalvos es una consecuencia del consumo de material de reserva y que se refleja en la disminución del índice de condición.

Los moluscos bivalvos marinos, experimentan cambios en la composición bioquímica mayoritaria de las gónadas y vísceras a lo largo del ciclo gametogénico. Las variaciones estacionales en las actividades metabólicas, son fruto de una serie de interacciones entre alimento disponible, condiciones ambientales, crecimiento y actividad reproductora (Gabbott, 1983).

Estudios previos sobre la composición bioquímica en la coquina realizados por Martínez *et al.* (1993) en la Ría de O Barqueiro, ponen de manifiesto que, *D. trunculus*, experimenta una variación en su composición bioquímica mayoritaria relacionada con el ciclo gametogénico. El contenido en carbohidratos desciende conforme avanza el ciclo, es decir, los máximos contenidos de carbohidratos en la gónada y víscera de la coquina,

se dan en períodos de reposo coincidiendo con las estaciones de otoño – invierno. Sin embargo, los valores mínimos se dan durante el estadio E3 de madurez y puesta que transcurre en esta especie, en meses de primavera – verano. La gónada en la coquina, presenta mayor contenido en carbohidratos que la víscera, como también sucede en *Ruditapes decussatus* por Rodríguez Moscoso (2000) y Ojea *et al.* (2002).

La evolución del contenido en carbohidratos sigue el mismo patrón en gónada y víscera. A este mismo resultado llegan Ansell *et al.* (1980), al realizar un análisis en la composición bioquímica de *D. trunculus* en las costas de Argelia donde concluyen que la proporción de carbohidratos alcanza valores máximos en otoño, experimentando una fuerte caída coincidiendo con el período de máximo desarrollo gonadal. Sin embargo en *D. vitattus*, el máximo valor de contenido en carbohidratos se da justo el mes previo al período de puesta, coincidiendo después los mínimos valores, al igual que *D. trunculus* con el período donde los desoves son más abundantes (Ansell, 1972).

Los lípidos en la gónada siguen un patrón de evolución opuesto a los carbohidratos, aumentando durante los meses de madurez, de marzo a julio, y disminuyendo en estadios de inactividad gonadal en las estaciones de otoño – invierno. Martínez *et al.* (1993) observaron una tendencia decreciente durante la puesta (abril a agosto) con una progresiva recuperación posterior.

La evolución de las proteínas de *D. trunculus*, componente mayoritario, no es tan variable como el resto de componentes bioquímicos. Con los resultados obtenidos, se observó que estas no muestran un patrón relacionado con el ciclo gametogénico. En otras especies como *R. decussatus*, Ojea (2013) también encontró que las proteínas presentan variaciones moderadas a lo largo del año.

En cuanto al contenido en cenizas, es algo menor en la gónada en comparación con el resto del cuerpo del individuo y presenta una evolución directamente relacionada con el ciclo gametogénico a la vez que coincide con la evolución experimentada por los lípidos. En este estudio, el contenido en cenizas en las gónadas de coquina, aumenta hacia los meses de marzo – abril, coincidiendo con la etapa de madurez de la especie y se mantienen para comenzar a descender a partir del mes de julio, momento en que los individuos avanzan hacia la postpuesta. El contenido de cenizas en las gónadas de

3. Ciclo gametogénico

coquina, parece seguir una evolución paralela al ciclo gametogénico, crece conforme este avanza. La evolución de las cenizas en *R. decussatus* según Jara Jara (1995), alcanza máximos en los meses de agosto, septiembre y octubre.

En resumen, a lo largo de la evolución del ciclo gametogénico, los carbohidratos mantienen una relación inversa con el ciclo gametogénico, disminuyen conforme este avanza. A medida que los carbohidratos disminuyen, los lípidos y cenizas aumentan, mientras que las proteínas mantienen un patrón de evolución estable y no relacionado con el ciclo.



4. Capítulo II. Desarrollo embrionario y larvario





4. CAPÍTULO II. DESARROLLO EMBRIONARIO Y LARVARIO

4.1. INTRODUCCIÓN

Los moluscos bivalvos producen larvas planctónicas las cuales pasan por una serie de estadios de desarrollo antes de su fijación al sustrato y comienzo de la vida bentónica (Tiwari y Gallager, 2003). El conocimiento de los diferentes estadios embrionarios y tiempos de transformación, constituye una parte importante en el proceso de optimización del cultivo de cualquier especie de molusco bivalvo.

El desarrollo larvario se ha descrito en varias especies de la familia Donacidae como es el caso de *Donax variabilis* Say, 1822 (Chanley, 1969), *D. vittatus* (da Costa, 1778) (Frenkiel y Moñeza, 1979) y *D. obesulus* Reeve, 1854 (Carstensen *et al.*, 2010). También existen estudios de otras especies de bivalvos usando microscopía óptica (Loosanoff y Davis, 1963; Loosanoff *et al.*, 1966; Sastry, 1979; Cerviño-Otero *et al.*, 2009; Cerviño-Otero, 2011; da Costa, 2009; Aranda-Burgos *et al.*, 2009). La extrema similitud entre estadios larvarios tempranos en especies de moluscos bivalvos, hace difícil su identificación usando únicamente criterios morfológicos, por lo que el método de microscopía óptica es solo efectivo para aquellos estadios larvarios y especies morfológicamente diferentes (Garland y Zimmer, 2002).

El estudio al microscopio óptico permite obtener una visión de las diferencias morfológicas existentes entre los diversos estadios embrionarios y larvarios de cualquier especie de bivalvo, pero este tipo de microscopía no es suficiente si se necesitan obtener detalles estructurales. Para ello, se utilizan microscopios electrónicos que aportan una mayor resolución y permiten obtener imágenes tridimensionales, como es el caso del microscopio electrónico de barrido (SEM) o que aportan una visión de detalles ultraestructurales a nivel celular, como es el caso del microscopio electrónico de transmisión (TEM).

En la actualidad existen otros métodos de identificación como los inmunológicos (Paugam *et al.*, 2000; Lorenzo *et al.*, 2003) y los basados en la tecnología del ADN (Hu

et al., 1992; Toro, 1998; André *et al.*, 1999) aunque recientes estudios han permitido obtener descripciones precisas de los desarrollos de especies de bivalvos usando microscopía electrónica de barrido, combinada con microscopía electrónica de transmisión. La bibliografía recoge trabajos de especies de moluscos bivalvos con microscopía electrónica, como es el caso de *Ensis magnus* Schumacher, 1817 (da Costa *et al.*, 2008); *Ensis siliqua* y *Solen marginatus* (da Costa, 2009) o de Venéridos como *Chione cancellata* (Linnaeus, 1767) (Moüeza *et al.*, 2006); *Ruditapes decussatus* (Aranda-Burgos, 2010) y *Venerupis corrugata* (Gmelin, 1791) (Cerviño-Otero, 2011). Dentro de la familia Ostreidae, *Crassostrea virginica* (Carriker y Palmer, 1979); en la familia Semelidae de la especie *Scrobicularia plana* (da Costa, 1778) (Raleigh y Keegan, 2007) y en la familia Pteriidae de las especies *Pinctada margaritifera* (Linnaeus, 1758) (Doroudi y Southgate, 2003) y *Pteria penguin* (Röding, 1798) (Wassnig y Southgate, 2011).

En la actualidad, no existe un estudio previo completo de los desarrollos embrionario y larvario de la coquina, *D. trunculus*, usando estas dos modalidades de microscopía electrónica.

Otro aspecto importante en el desarrollo embrionario de los bivalvos es el proceso de formación de la glándula de la concha. Los primeros estudios fueron realizados por Gengenbaur en especies de gasterópodos y en bivalvos por Stepanoff (en Kniprath, 1980). La formación temprana de la glándula de la concha en *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758), fue observada por Kniprath (1980) con microscopía electrónica de transmisión (TEM). Con los resultados de este trabajo, el autor sigue el modelo descrito para los gasterópodos el cual sugiere, que la invaginación de la glándula debe cerrarse en su totalidad antes de la secreción del periostraco para la formación de la primera concha larvaria. Casse *et al.* (1998), en *Pecten maximus* Linnaeus, 1758, apoyan esta teoría. Sin embargo, Mouëza *et al.* (2006) en *Chione cancellata* proponen otro modelo de formación de la concha según el cual esta no migra hacia el interior y nunca constituye una invaginación por sí misma, sino que situada debajo de la prototroca se encuentra una hendidura abierta a partir de la cual se secreta la concha larvaria.

El objetivo de este capítulo es por tanto, averiguar a cuál de los dos modelos se ajusta la especie *D. trunculus* y describir con microscopía óptica, microscopía

electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM), el patrón de desarrollo embrionario y larvario de la especie, así como la morfología y estructura de las larvas para poder realizar una mejora de su cultivo en criadero.



4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1. Obtención de gametos y larvas

Los progenitores procedentes del medio natural, previamente recogidos en los bancos de Vilarrube en Valdoviño y Abrela en O Vicedo, se trasladaban al criadero y se depositaban en tanques con una capacidad de 200 litros, con un flujo continuo de agua de mar filtrada. Para la obtención de desoves, los progenitores se mantuvieron en seco a una temperatura de 4°C durante 12 horas y posteriormente se introdujeron en agua de mar a 20°C. Cuando comenzaron a expulsar gametos, los reproductores se separaron por sexos y se aislaron en recipientes de vidrio independientes. Para el seguimiento embrionario, los ovocitos obtenidos se mezclaron en un vaso de precipitados y se fecundaron. La experiencia se realizó por triplicado para confirmar los tiempos de aparición de cada estadio. El número de hembras que intervinieron en cada uno de los tres desoves fue de: 24; 17 y 23, respectivamente.

Para el estudio del desarrollo larvario, los huevos obtenidos fueron recogidos e incubados en tanques de 500 L con agua de mar a una temperatura de $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ y una ligera aireación constante. Las larvas se alimentaron diariamente con un dieta mixta de microalgas. El cultivo larvario se realizó siguiendo el método descrito ampliamente, en el capítulo III.

4.2.2. Visualización al microscopio óptico

Para controlar los tiempos en los que aparecen las diferentes fases del desarrollo embrionario de la coquina, se observó el desove desde la fase de huevo a larva trocófora *in vivo*, cada 10 minutos al microscopio óptico. Desde la fase de trocófora hasta larva D se tomaron muestras cada hora y, a partir de este momento, el control se hizo diariamente. En cada estadio del desarrollo se tomaron al menos 100 individuos, se midieron y fotografiaron con cámara en un analizador de imagen NIS-Elements BR 3.0 de Nikon, acoplado a un microscopio óptico Nikon Labophot-2. Se consideró la aparición de un nuevo estadio cuando lo presentaban al menos el 50% de los individuos.

4.2.3. Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido

La preparación de muestras para realizar un visionado al microscopio electrónico de barrido (SEM) consta de un proceso de fijación, deshidratación, una sustitución para llevar a cabo el proceso de desecación, montaje en soportes específicos y posterior recubrimiento en oro. A continuación, se describen todos los pasos previos al visionado:

1. Fijación

El proceso de fijación ha de realizarse en cabina de gases y consta de:

- Fijación de la muestra en glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato 0,1 M durante 4 h a 4°C.
- Varios lavados de la muestra con tampón cacodilato (entre 3 y 12 h) a 4°C.
- Postfijación en tetróxido de osmio (OsO_4) al 1% en el mismo tampón durante 1 h a 4°C.
- Último lavado con tampón cacodilato quedando la muestra lista para la deshidratación.

2. Deshidratación

Para una correcta deshidratación se hace primero un lavado con agua destilada para eliminar sales y otros electrolitos, posteriormente el agua de estos tejidos ha de ser eliminada.

- Comienza con etanol al 30% durante 15 min.
- A continuación se lleva a cabo la siguiente escala de etanoles:
 - 50% - 2 x 15 ó 3 x 10 min
 - 70% - 2 x 15 ó 3 x 10 min
 - 80% - 2 x 15 ó 3 x 10 min
 - 90% - 2 x 15 ó 3 x 10 min
 - 100% - 3 x 15 min

3. Sustitución

Sustituir el etanol por un líquido que sea miscible con el CO₂ líquido para una posterior desecación total en la cámara de Punto Crítico.

➤ Para ello es necesario realizar la siguiente escala Amiloacetato – Etanol:

- 1:3 - 2 x 15 ó 3 x 10 min
- 2:2 - 2 x 15 ó 3 x 10 min
- 3:1 - 2 x 15 ó 3 x 10 min
- Amiloacetato 100% - 3 x 15 min

4. Desecación

Se lleva a cabo en el Desecador de Punto Crítico. Este proceso permite mantener la estructura intacta al sustituir los líquidos internos por gas.

5. Recubrimiento en oro y montaje en “stubs”

Para la correcta observación de las muestras al microscopio estas han de hacerse conductoras, para lo cual se recubrirán en oro una vez montadas en portamuestras de aluminio.

6. Visionado de muestras

Tras el procesado, se procedió a la visualización de las muestras en un microscopio electrónico de barrido Philips XL30 ubicado en el Centro de Apoyo Científico - Tecnológico a la Investigación (CACTI) de la Universidad de Vigo.

En el caso de los espermatozoides de la coquina, fue necesario la utilización de un microscopio de barrido medioambiental FEI Quanta 200, para evitar la aparición de posibles artefactos resultado del procesado de las muestras.

4.2.4. Preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión

Desde el estadio de gástrula hasta la aparición de la larva D, se tomaron muestras cada dos horas para ser observadas mediante microscopía electrónica de transmisión.

La fijación de las muestras se realizó con glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato sódico 0,1 M; pH 7,2 a 4°C durante 4 h. Se realizaron lavados con el mismo tampón y una posterior postfijación en tetróxido de osmio a temperatura ambiente durante 45 min.

A continuación se realiza un proceso de deshidratación siguiendo la siguiente escala de acetonas a 4°C:

- Acetona 50%: 10 min
- Acetato de uranilo 1% en acetona 70%: 1 h
- Acetona 70%: 2 × 15 min
- Acetona 80%: 2 × 15 min
- Acetona 90%: 2 × 15 min
- Acetona 95%: 2 × 15 min
- Acetona 100%: 2 × 15 min

Tras la deshidratación, se realiza una impregnación en resina Spurr, en nevera a 4°C y rotor, mediante los siguientes pasos:

- Spurr: Acetona, 1:3: 2 h
- Spurr: Acetona, 1:1: 2 h
- Spurr: Acetona, 3:1: 3-4 h

Después tiene lugar una inclusión en resina total a temperatura ambiente:

- Resina total: 2-5 h
- Resina total: 12 h
- Resina total: 2 h

4. Desarrollo embrionario y larvario

Por último, se realizará una última inclusión con resina Spurr a 60°C durante 48 horas.

Para realizar cortes de los bloques se lleva a cabo un piramidado de los mismos con un piramidotomo Leica Ultratrim. Los cortes semifinos obtenidos se tiñen con azul de metileno y, mediante observación al microscopio óptico, se irán seleccionando las zonas cuyo visionado resulte de interés. Después se repiramidó el bloque y se realizaron cortes ultrafinos de aproximadamente 70-90 nm, con el ultramicrotomo Leica Reichert Ultracut.

Las muestras han de ser sometidas a tinción negativa que permita contrastarlas mediante una sustancia que resulte opaca a los electrones. Para ello se impregnan los cortes ultrafinos con disoluciones de metales pesados, de alto número atómico, que resultan opacas a los electrones transmitidos. En este caso, se aplicó una disolución acuosa de acetato de uranilo 2% durante 30 min y una disolución de citrato de plomo durante 10 min.

Se emplearon dos tipos diferentes de microscopios en función del visionado general o en detalle de las muestras embrionarias y larvarias. Se utilizó el Dual Beam Focused Ion Beam (FIB) FEI Helios 600 Nanolab para fotografías de embriones completos y el Jeol Jem 1010 para los detalles.

4.3. RESULTADOS

En la tabla IV.1, se muestran los tiempos de aparición de cada uno de los estadios embrionarios y larvarios de *D. trunculus*, así como el tamaño medio de cada uno de ellos.

Tabla IV.1. Estadios embrionarios y larvarios de *D. trunculus*. Tiempos de aparición desde el momento de la fertilización y tallas medias de cada estadio.

Estadio	Tiempo post-fertilización	Talla (μm)
Huevo sin fertilizar	0 h	75-85
Estadio de 2 células	1 h 15 min	
Estadio de 4 células	2 h 5 min	
Estadio de 8 células	3 h 5 min	
Estadio de 16 células	4 h 20 min	
Estadio de 32-64 células	5 h 20 min	
Blástula	7 h 20 min	
Gástrula	9 h	
Trocófora	15 h	90-95
Larva D	41 h	105-110
Larva umbonada	8 días	130-170
Larva pediveliger	22 días	200-250
Postlarva	31 días	250-300

El ovocito de la coquina era esférico, de color parduzco y con una delgada cubierta refringente visible al microscopio óptico (Figura 4.1). Al microscopio electrónico de barrido (SEM), el aspecto de su superficie externa era rugoso (Figura 4.12). El diámetro de los ovocitos osciló entre 75 y 85 μm .

Los espermatozoides, tenían una cabeza de forma cilíndrica con cuatro mitocondrias en la base. Al microscopio electrónico se observó que el conjunto de cabeza y parte media del espermatozoide tenían una longitud de 4,4 μm (Figura 4.11).

Tras 20 min post-fertilización (pf), se produjo la extrusión del primer corpúsculo polar (Figuras 4.2 y 4.13). Se observó la extrusión de un segundo corpúsculo polar, que no siempre es evidente, en el estadio de trébol (Figura 4.14). Precediendo la primera división, se formó un lóbulo polar de gran tamaño en el polo vegetal del huevo, dando lugar al estadio de trébol (Figura 4.3), en el que se produjo un estrangulamiento de este lóbulo quedando unido por un estrecho tallo al resto del huevo. Como resultado, el huevo quedó dividido en dos blastómeros nucleados de igual tamaño y en un lóbulo polar anucleado.

El estadio de 2 células, se alcanzó 1 h y 15 min después de la fecundación. En el plano de división se observó el corpúsculo polar y el resultado fue la formación de dos blastómeros de tamaño desigual, uno de mayor tamaño en el polo vegetal (CD) y otro menor en el polo animal (AB) (Figuras 4.4 y 4.15).

Tras 2 h y 5 min post-fertilización, se observó el estadio de 4 células constituido por tres blastómeros de similar tamaño (A, B y C) en el polo animal y un macrómero (D) en el polo vegetal (Figuras 4.5 y 4.16).

El estadio de 8 células (3 h y 5 min pf) estaba constituido por un macrómero localizado en el polo vegetal y siete micrómeros dispuestos en el polo animal (Figuras 4.6 y 4.17).

A las 4 h y 20 min la mayor parte de los individuos se encontraban en estadio de 16 células (Figuras 4.7 y 4.18).

Pasadas 5 h y 20 min pf, el embrión continúa dividiéndose llegando al estadio de 32 células donde aún era visible un macrómero en el polo vegetal (Figuras 4.8 y 4.19). Este comenzó a no ser patente cuando el embrión estaba en estadio de 64 células dado que el elevado número de divisiones, dificultó su observación con microscopía electrónica (Figura 4.9).

A las 7 h y 20 min los micrómeros comenzaron a recubrir el macrómero hasta envolverlo completamente y se alcanzó el estadio de blástula que fue el primer estadio embrionario móvil debido a la presencia de cilios (Figuras 4.10 y 4.20).

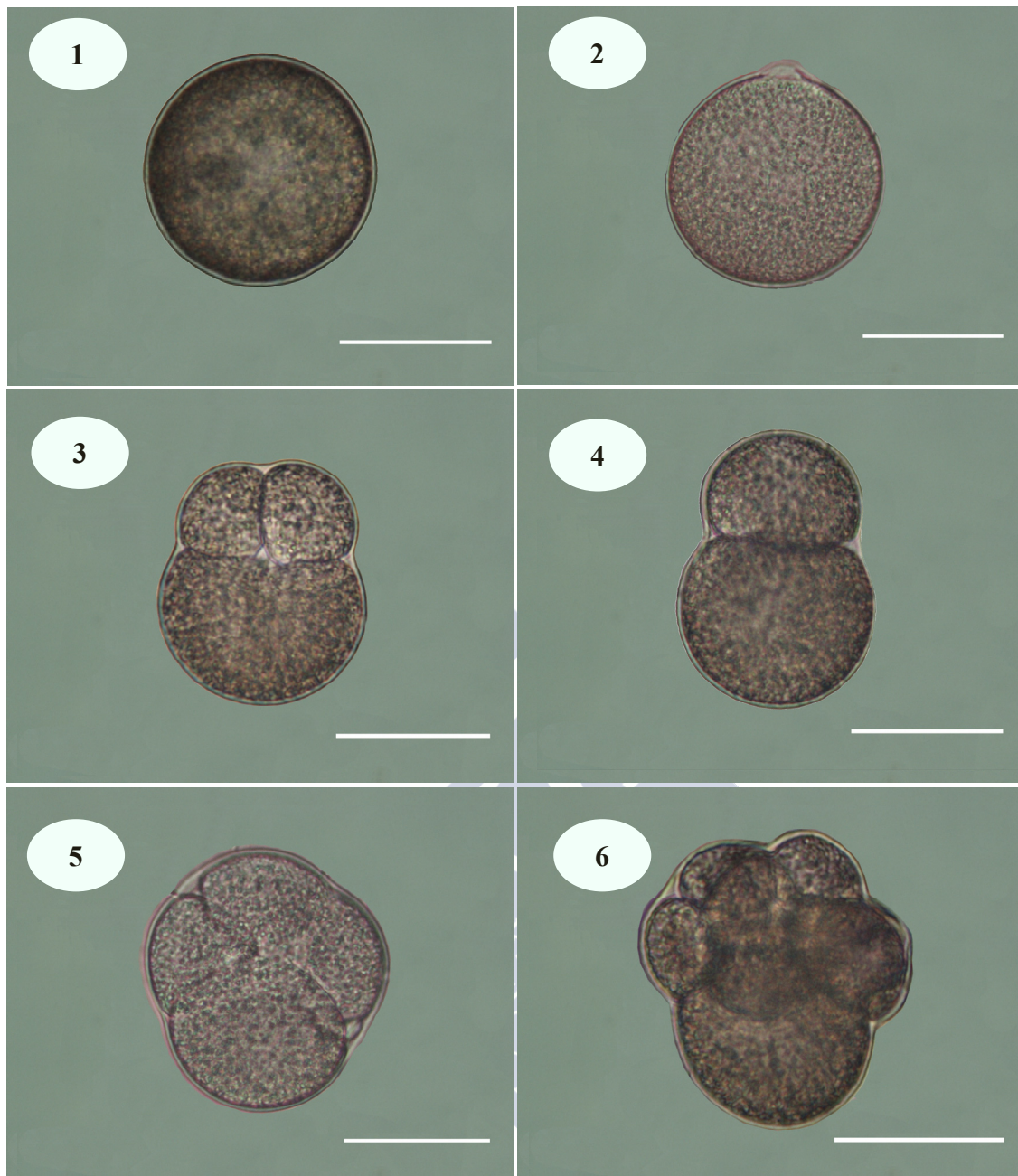


Figura 4. (1-6). Fotografías al microscopio óptico del desarrollo embrionario de *D. trunculus*. 1) Ovocito sin fecundar. 2) Aparición del primer corpúsculo polar. 3) Estadio de trébol. 4) Estadio de 2 células. 5) Estadio de 4 células. 6) Estadio de 8 células. Barras de escala 50 μm .

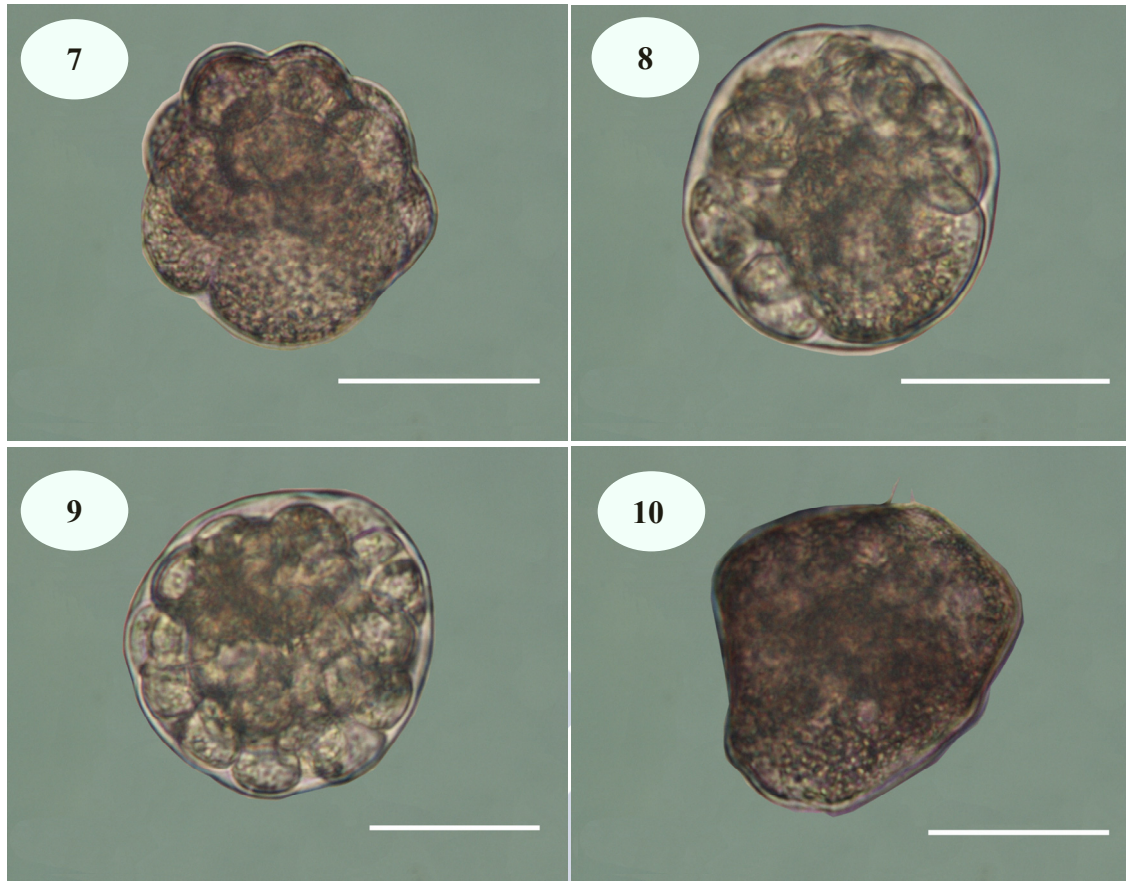


Figura 4. (7-10). Fotografías al microscopio óptico del desarrollo embrionario de *D. trunculus*. 7) Estadío de 16 células. 8) Estadío de 32 células. 9) Estadío de 64 células. 10) Blástula. Barras de escala 50 μ m.

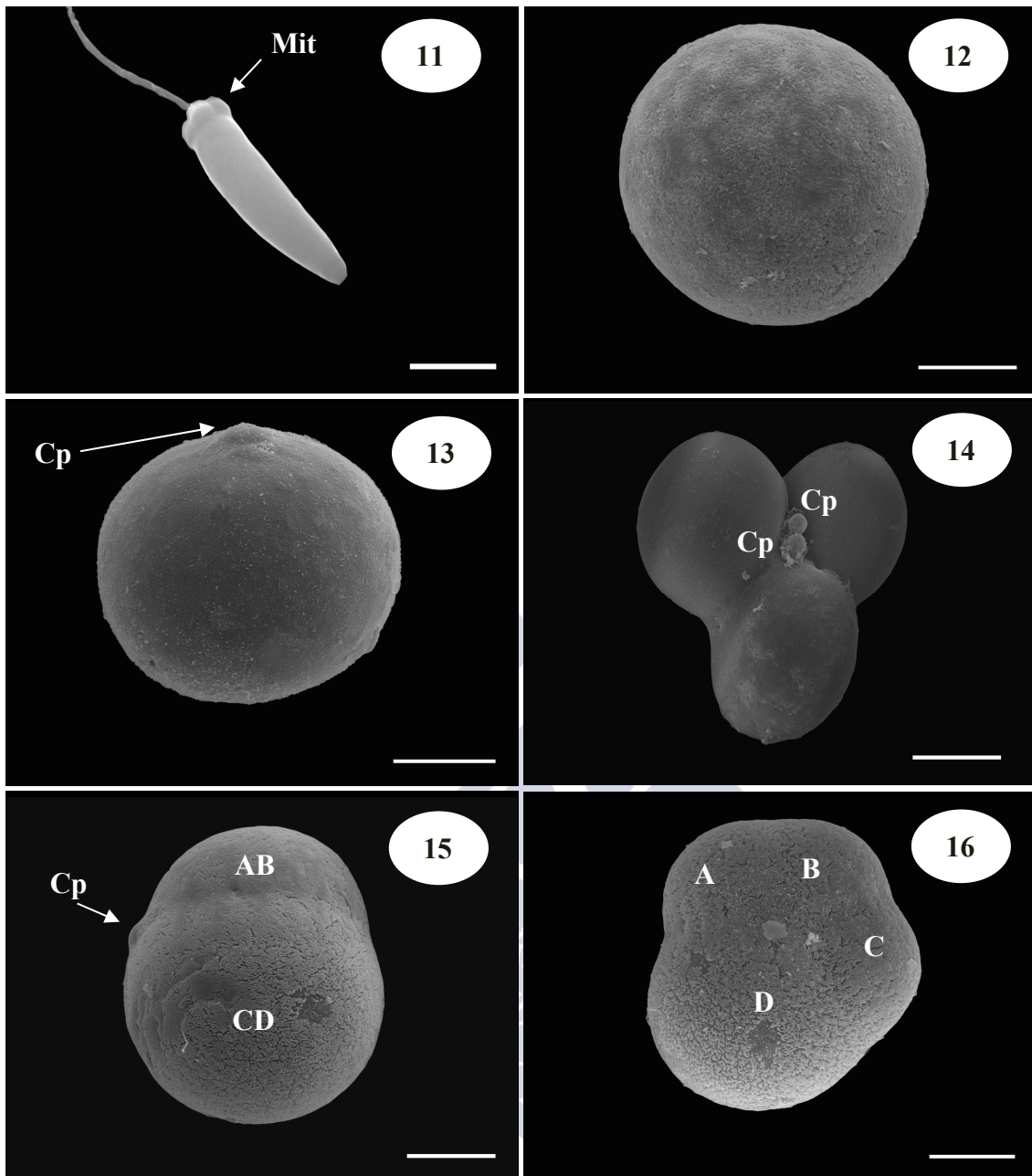


Figura 4. (11-16). Fotografías al microscopio electrónico de barrido del desarrollo embrionario de *D. trunculus*. 11) Espermatozoide con mitocondrias (Mit) en la región basal de la cabeza. Barra de escala 2 μm . 12) Ovocito. 13) Extrusión del corpúsculo polar (Cp). 14) Estadio de trébol con el primer y el segundo corpúsculo polar (Cp). 15) Estadio de 2 células (AB, CD) con corpúsculo polar (Cp) en la región meridional. 16) Estadio de 4 células (A, B, C y D). Barras de escala 20 μm .

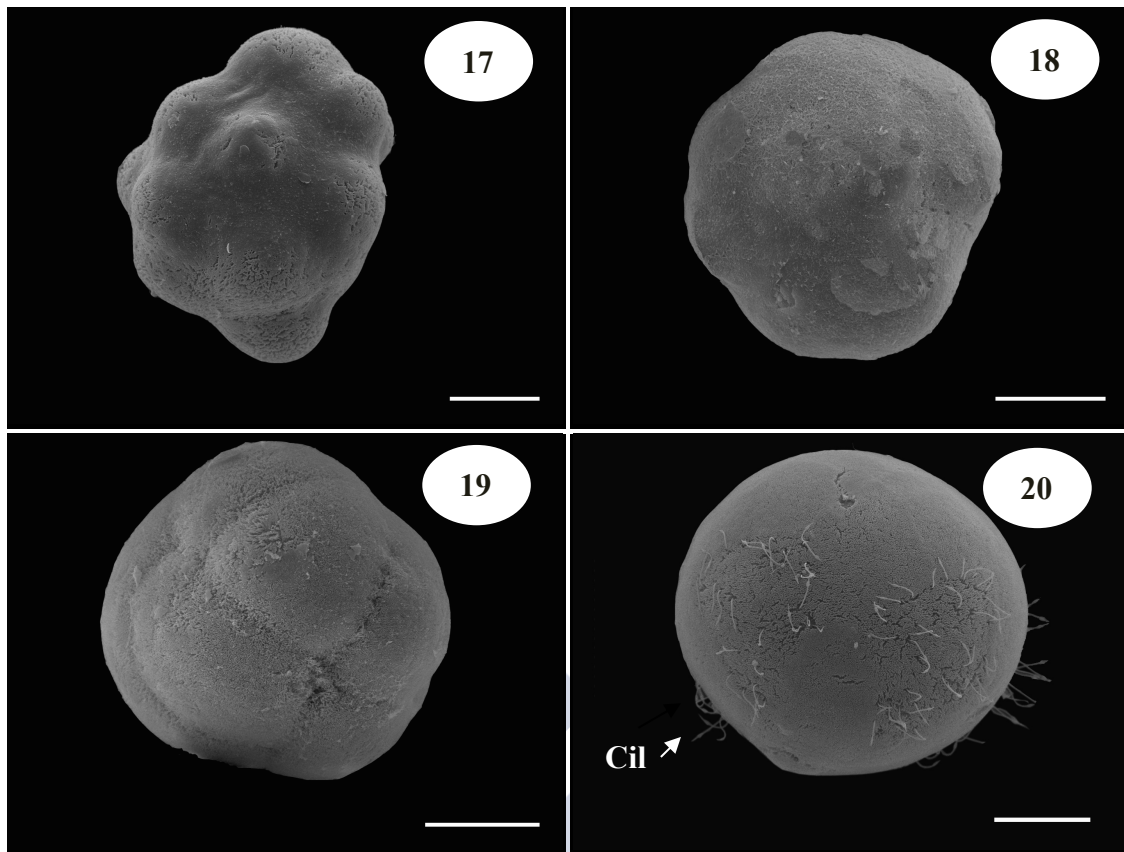


Figura 4. (17-20). 17) Estadío de 8 células. 18) Estadío de 16 células. 19) Estadío de 32 a 64 células. 20) Blástula, aparición de los primeros cilios (Cil). Barras de escala 20 μ m.

A las 9 horas post-fertilización (hpf), comenzó la gastrulación por epibolia. Durante este proceso, los micrómeros se multiplicaron de una forma rápida y se situaron rodeando al macrómero (Figura 4.21).

Mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) se observó la gástrula con cilios de mayor longitud que en el estadío de blástula (Figura 4.22). En el polo vegetal, se diferenció una invaginación que dará lugar al blastoporo, el cual se irá desplazando hacia la región ventral a medida que avanza la gastrulación. En la región opuesta, apareció otra hendidura correspondiente a la invaginación de la glándula de la concha patente en la figura 4.23.

En las figuras 4.24-27, se observan secciones del estadío de gástrula de *D. trunculus* al microscopio electrónico de transmisión (TEM). En la figura 4.24, se distingue una sección transversal de una gástrula temprana, en ella aparece la invaginación de la glándula de la concha en posición dorsal. En la figura 4.25, la

sección de la gástrula es sagital y se aprecia la invaginación de la glándula de la concha desde otro plano. En la figura 4.26, la sección permite una visión sagital del blastoporo y de la invaginación de la glándula de la concha.

A medida que avanza el estadio de gástrula en su proceso de transición a larva trocófora, en la invaginación de la glándula de la concha se diferenciaron diversos tipos celulares: células T3, que participan en la secreción de la matriz orgánica de la concha y células secretoras T1 (Figura 4.27). Las células T1, presentaban unas pocas microvellosidades, mientras que las células T3 estaban totalmente desprovistas de ellas. A la izquierda y en la parte inferior de la figura (indicado con una estrella), comienza a observarse la pérdida de cilios y comienzo del depósito de carbonato cálcico en forma de aragonito, que dará lugar al periostraco.



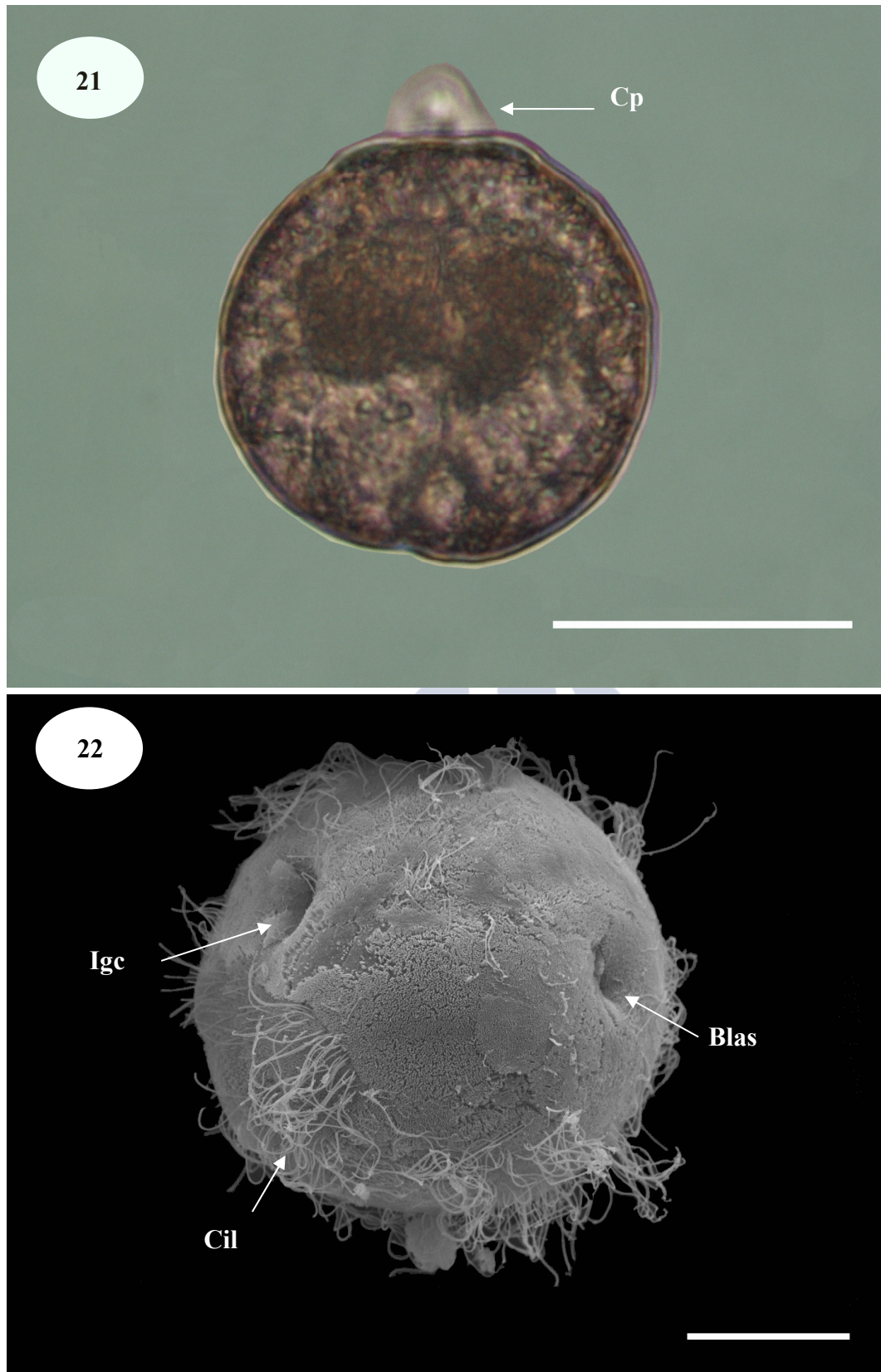


Figura 4. (21-22). 21) Fotografía de gástrula de *D. trunculus* al microscopio óptico con corpúsculo polar (Cp) en el polo vegetal. Barra de escala 50 μm . 22) Gástrula al microscopio electrónico de barrido, se observan: blastoporo (Blas), invaginación de la glándula de la concha (Igc) y cilios (Cil) (9 hpf). Barra de escala 20 μm .

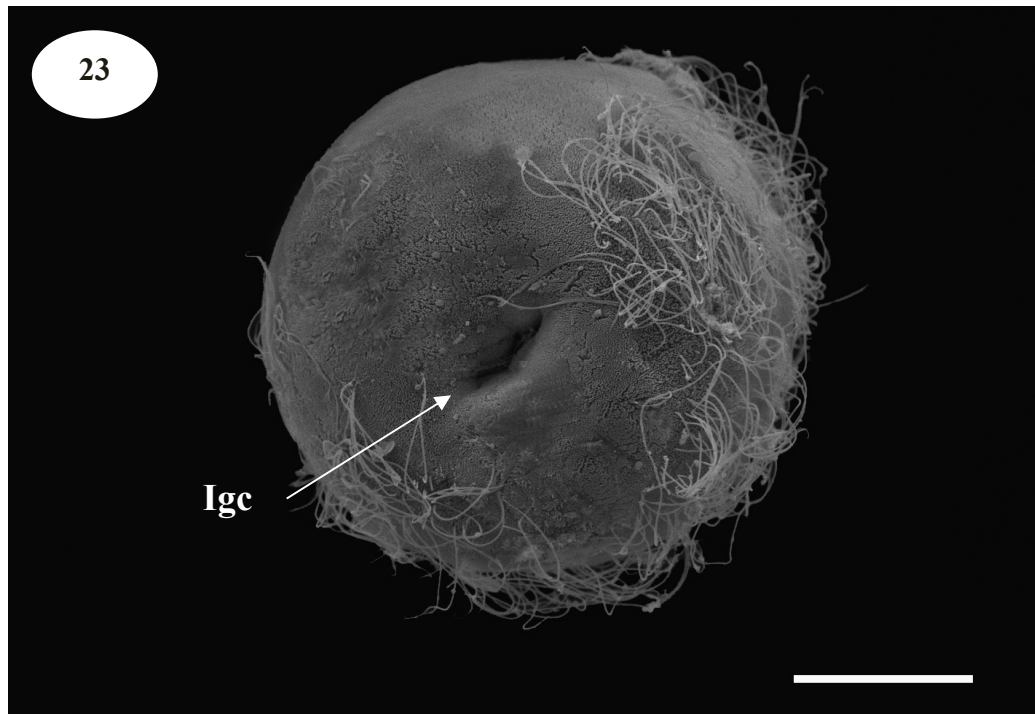


Figura 4.23. Gástrula al microscopio electrónico de barrido (SEM) con detalle de invaginación de la glándula de la concha (Igc) (11 hpf). Barra de escala 20 μ m.

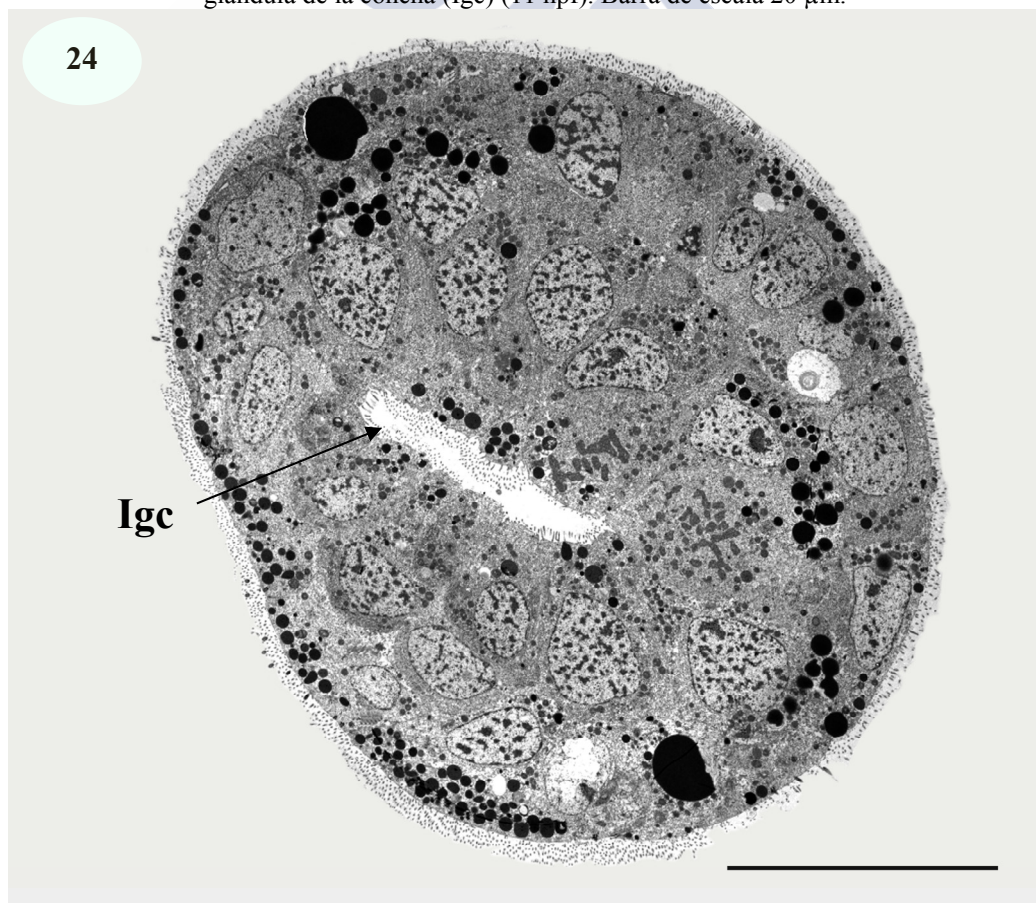


Figura 4.24. Gástrula al microscopio electrónico de transmisión (TEM). Sección transversal de una gástrula temprana con invaginación de la glándula de la concha (Igc) en posición dorsal (11 hpf). Barra de escala 20 μ m.

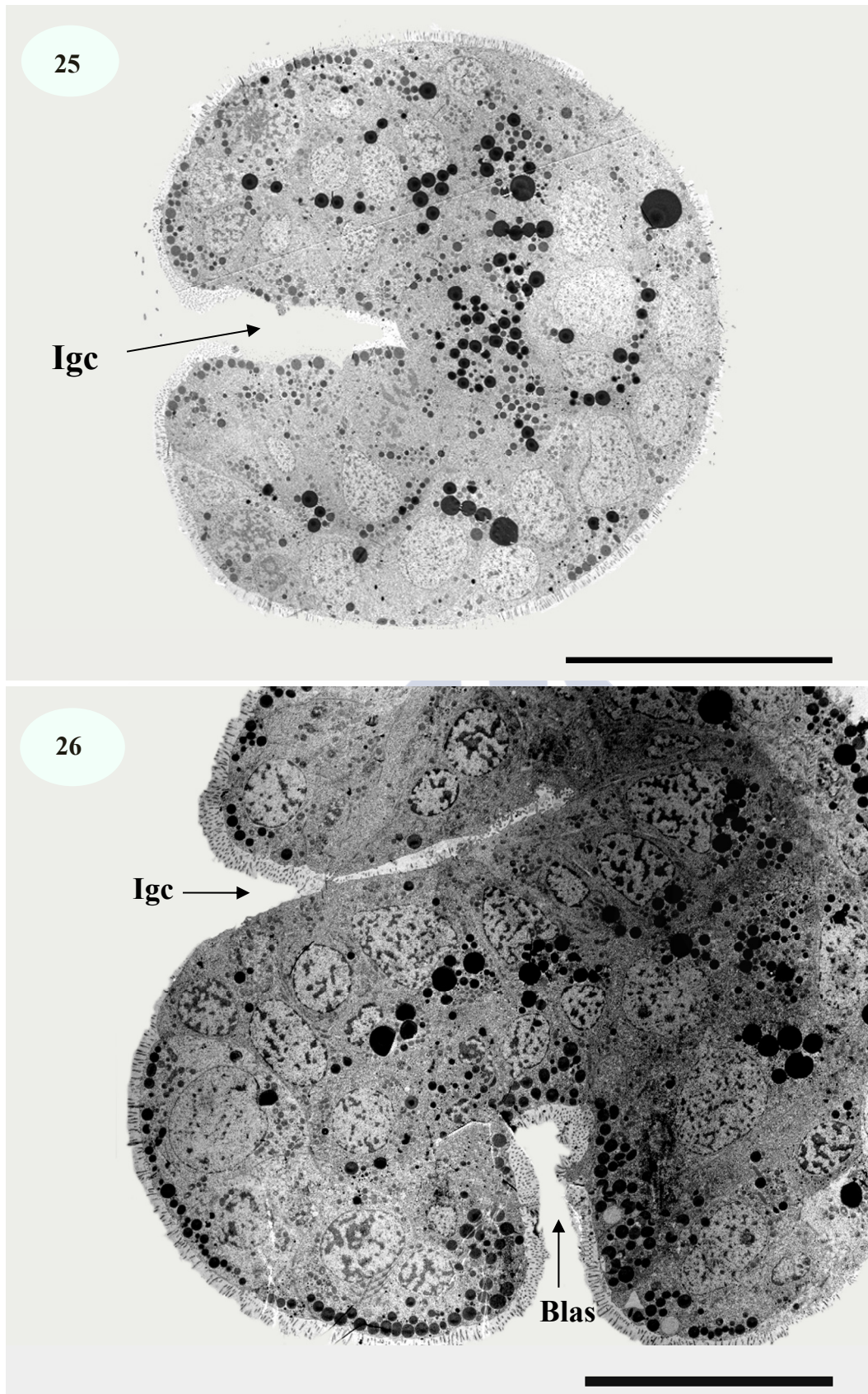


Figura 4. (25-26). Fotografías al microscopio electrónico de transmisión (TEM). 25) Sección sagital de una gástrula temprana con invaginación de la glándula de la concha (Igc) (11 hpf). 26) Sección sagital del estadio de gástrula, se observan blastoporo (Blas) e invaginación de la glándula de la concha (Igc) (13 hpf). Barras de escala 20 μ m.

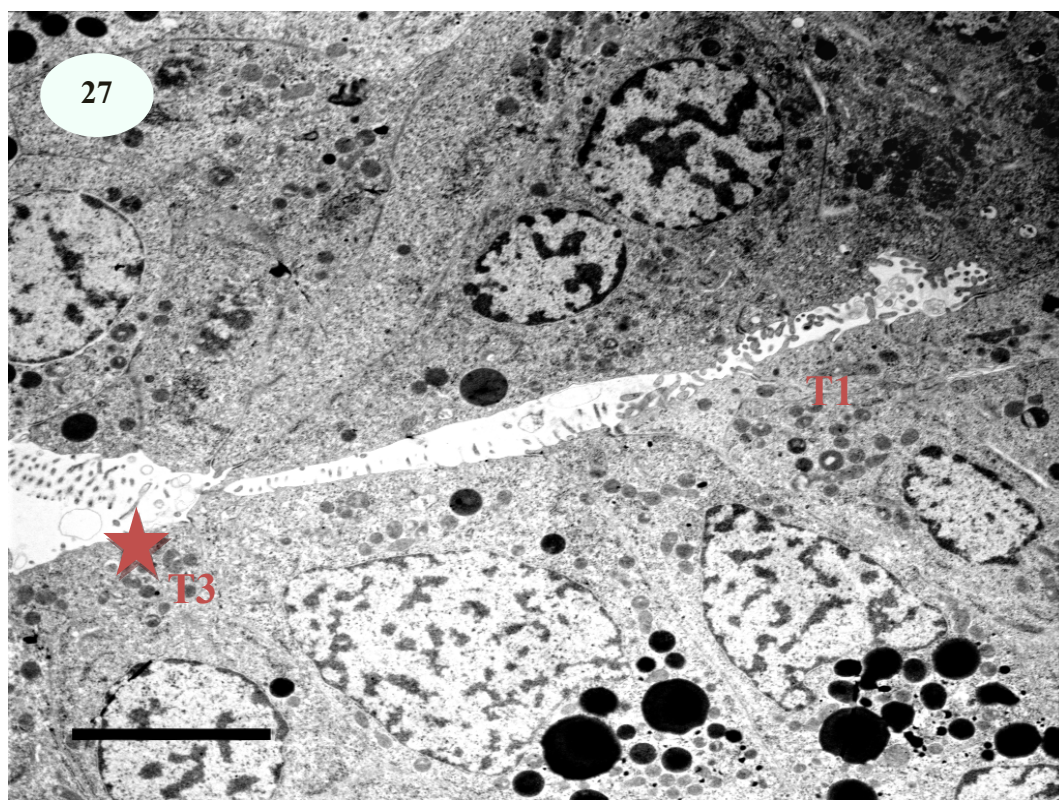


Figura 4.27. Fotografía de la coquina al microscopio electrónico de transmisión (TEM). Detalle de la invaginación de la glándula de la concha con tipos celulares T1 y T3 (13 hpf). Detalle de secreción indicado con una estrella. Barra de escala 5 µm.

A las 15 horas post-fertilización (hpf), la gástrula se transformó en una larva trocófora piriforme y ciliada (Figura 4.28). La larva trocófora estaba provista de una corona de cilios denominada prototroca, que la divide en dos regiones desiguales. La región anterior, de menor tamaño, posee una corona de cilios denominada metatroca, en cuyo ápice se sitúa un mechón de cilios de mayor longitud que recibe el nombre de penacho apical (Figura 4.30). En la región posterior existe otra corona de cilios junto al ano que forman la telotroca (Figuras 4.29 y 4.31). En esta misma región se localiza en su zona ventral el blastoporo que evolucionará para dar lugar a la boca. En la región dorsal, opuesta al blastoporo, se diferencia una hendidura oblicua con forma de herradura que es la invaginación de la glándula de la concha (Figuras 4.32 y 4.33). En estadios tardíos de la larva trocófora, la glándula de la concha comenzó a secretar la prodisoconcha I que aún no estaba calcificada y cuyo aspecto era membranoso (Figura 4.34).

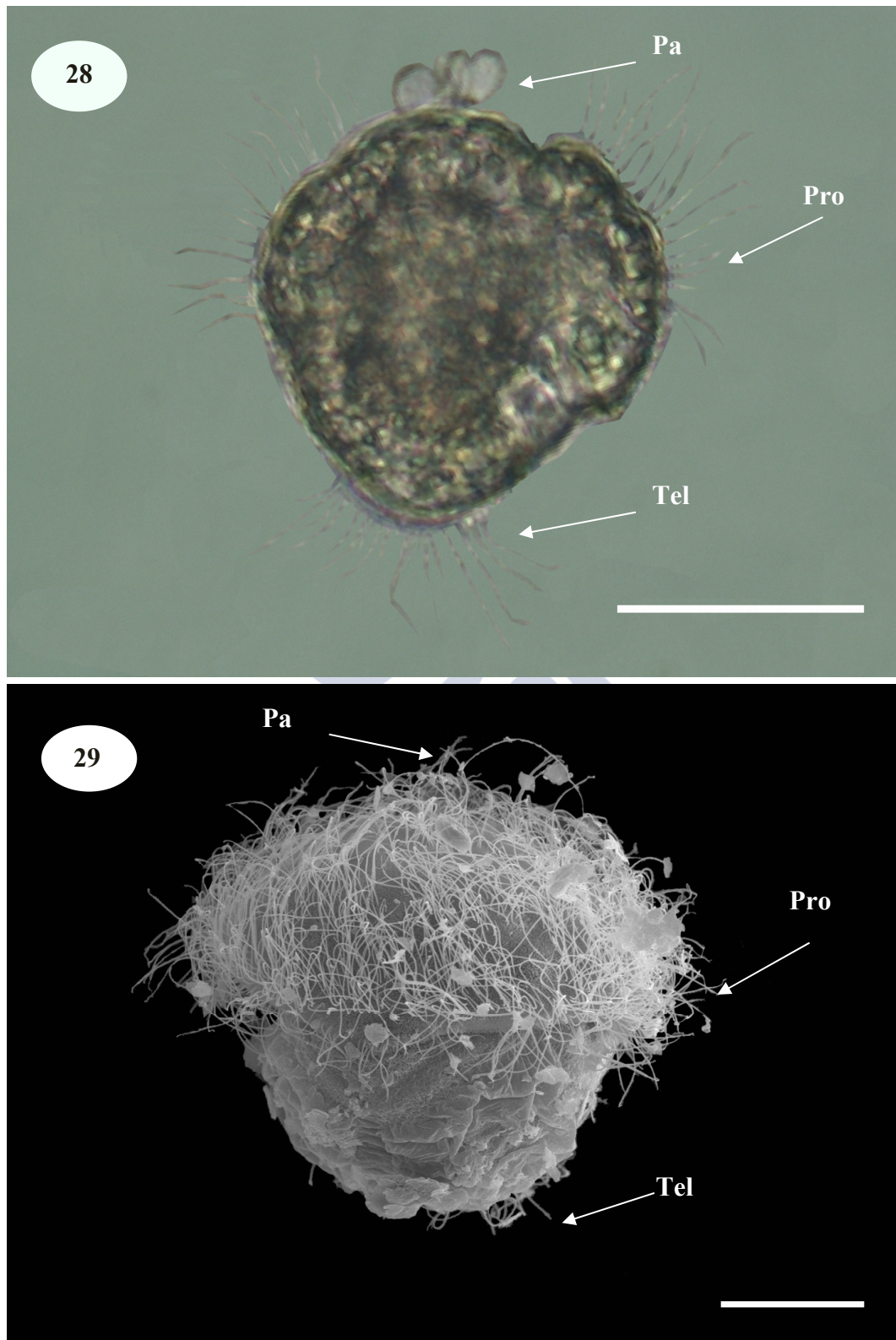


Figura 4. (28-29). Fotografías al microscopio óptico (28) (barra de escala 50 μm) y al microscopio electrónico de barrido (SEM) (29) (15 hpf) (barra de escala 20 μm). Penacho apical (Pa), prototroca (Pro) y telotroca (Tel).

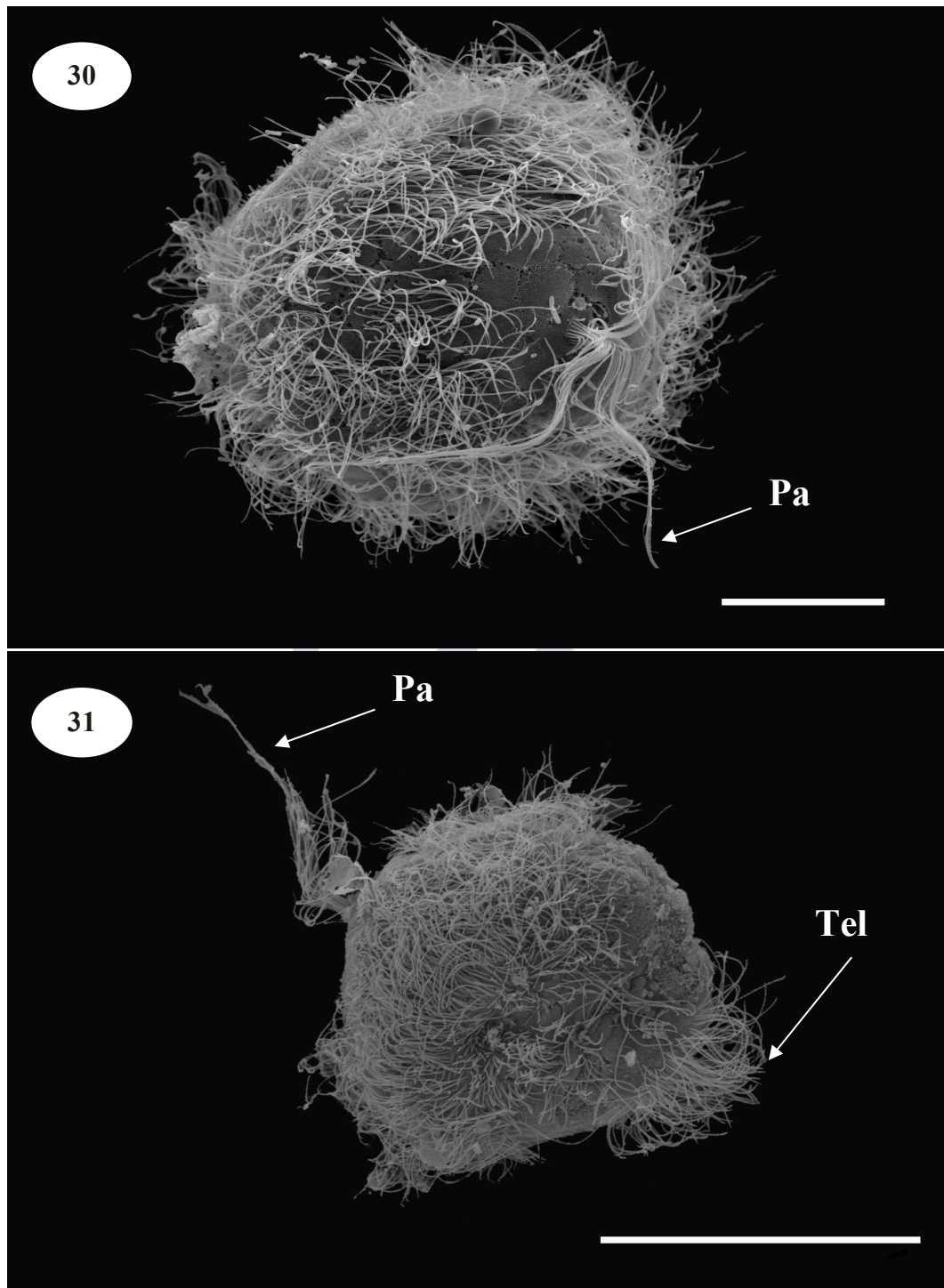


Figura 4. (30-31). 30) Detalle del penacho apical (Pa) del estadio de trocófora de la coquina al microscopio electrónico de barrido (SEM) (17 hpf). Barra de escala 20 μm . 31) Detalle de la telotroca (Tel) y penacho apical (Pa) (17 hpf). Barra de escala 50 μm .

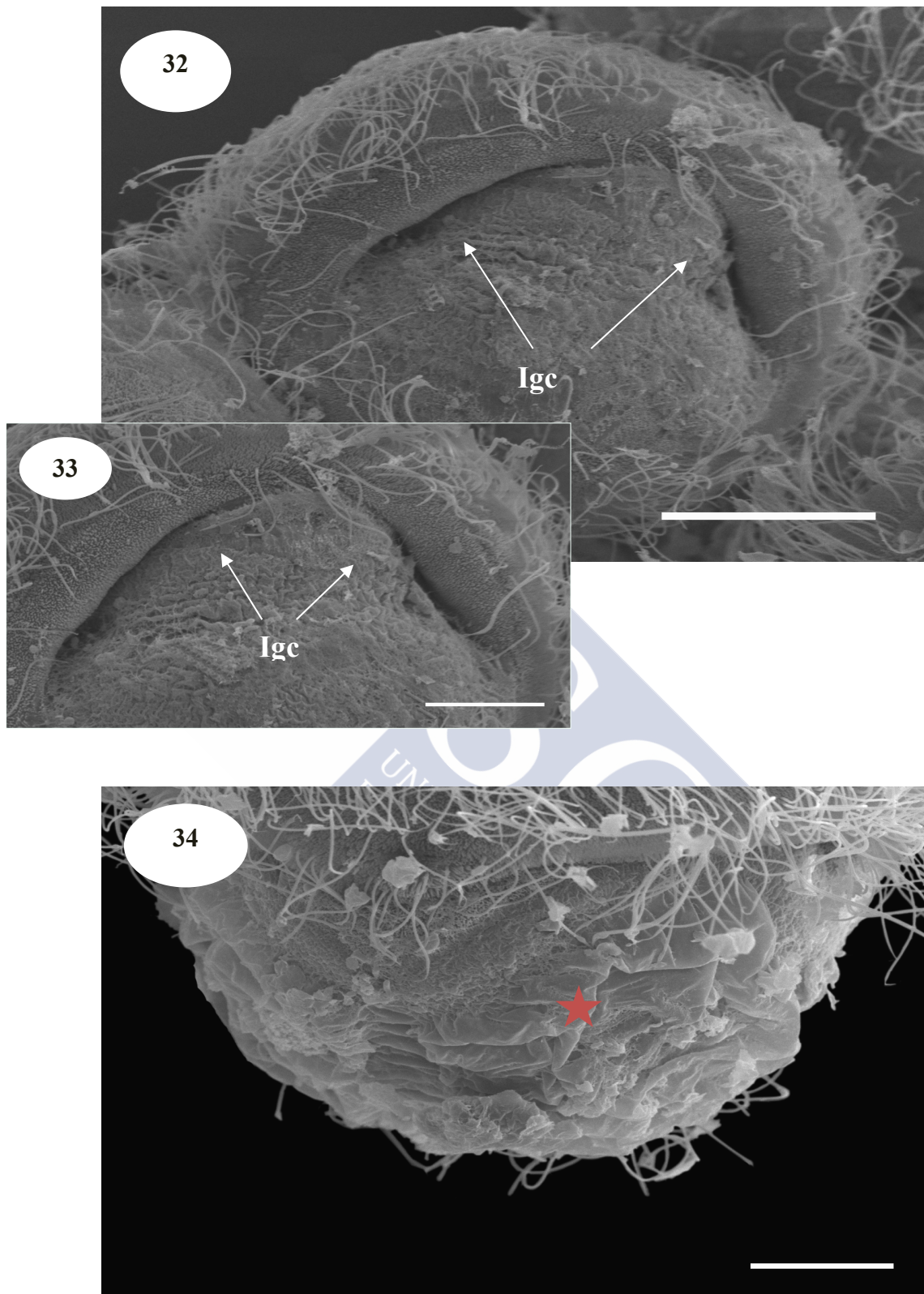


Figura 4. (32-34). Fotografías del estadio de larva trocófora al microscopio electrónico de barrido (SEM). 32 y 33) Secreción de la concha por la invaginación de la glándula de la concha (Igc) (19 hpf). Barras de escala 20 y 10 μm , respectivamente. 34) La secreción de la concha larvaria avanza (estrella) (21 hpf). Barra de escala 10 μm .

En la figura 4.35, se observa una larva trocófora tardía en su transición a larva D. En ella se aprecia cómo avanza la secreción de la concha que cubrirá los flancos derecho e izquierdo, apareciendo estos separados por una línea divisoria de aspecto inicial membranoso que constituirá la futura charnela. En este estadio aún se observaron la prototroca y la telotroca que desaparecerán en el siguiente estadio.

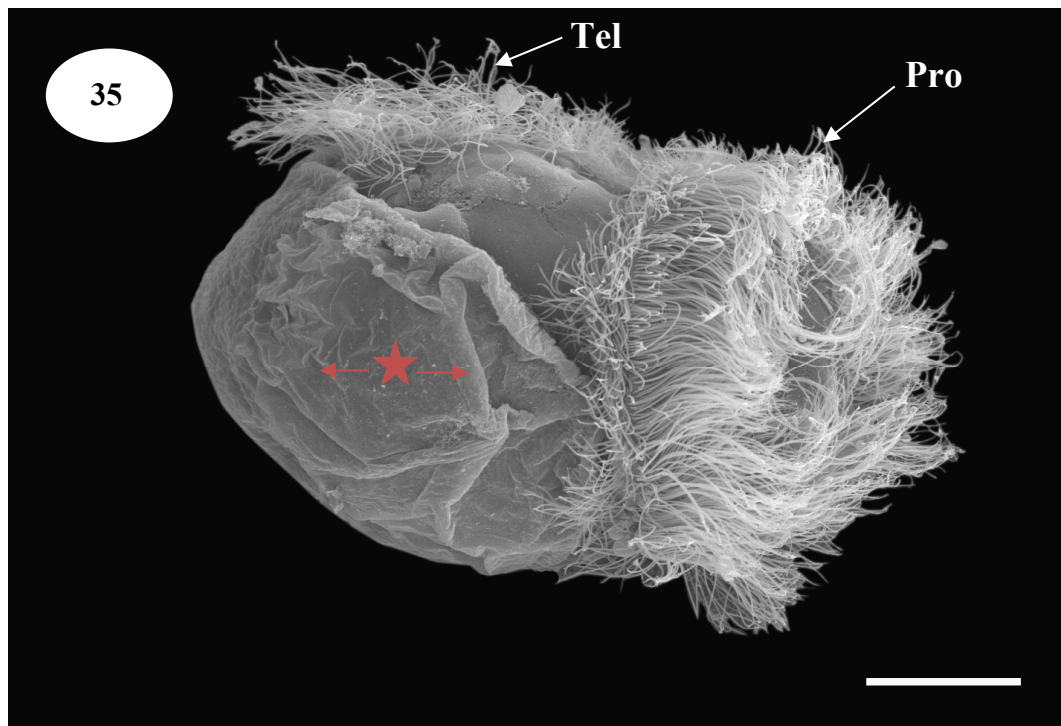


Figura 4. (35). Imagen de la larva trocófora en transición a larva D al microscopio electrónico de barrido (SEM) (30 hpf). Se aprecia la secreción de la glándula de la concha (estrella), la prototroca (Pro) y la telotroca (Tel). Barra de escala 20 μ m.

Con microscopía electrónica de transmisión a las 30 hpf aún se observaba la telotroca, prototroca y la glándula de la concha con secreción del periostraco (Figura 4.36).

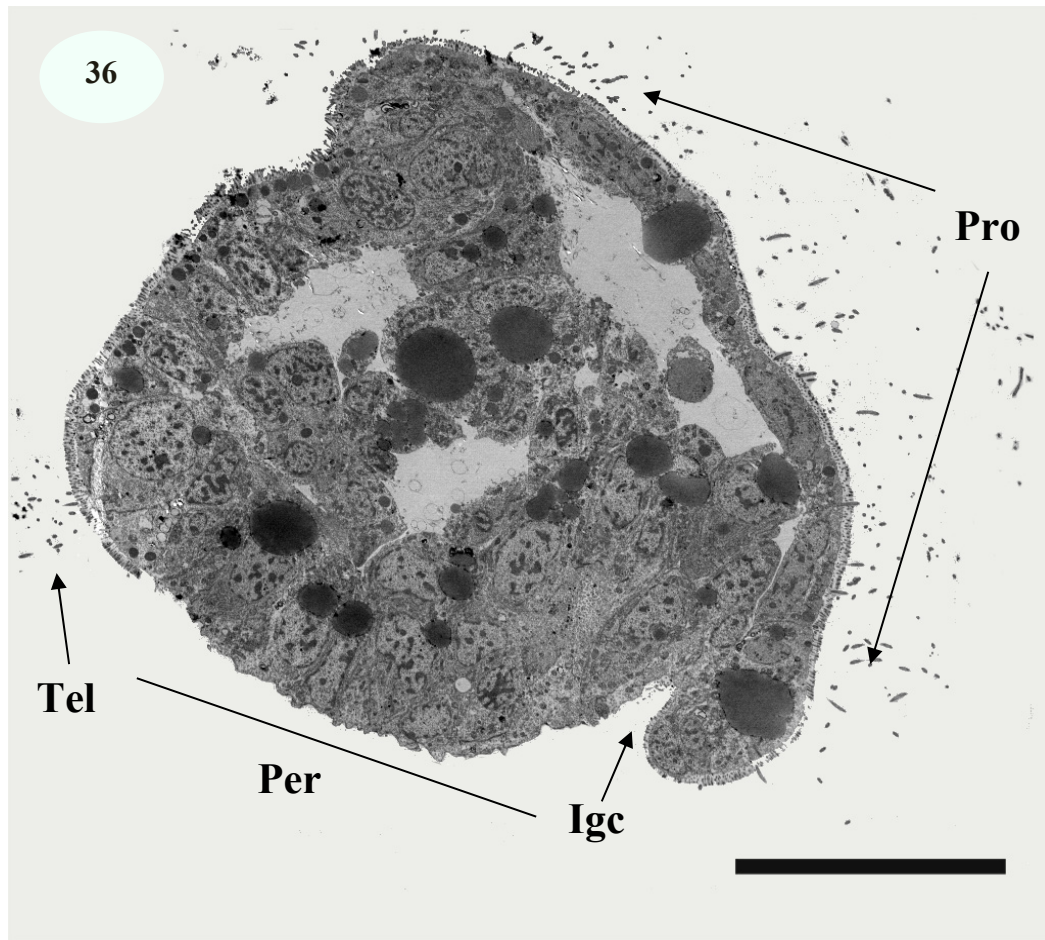


Figura 4. (36). Sección longitudinal de larva trocófora en transición a larva D al microscopio electrónico de transmisión (TEM) (30 hpf). Se observan: prototroca (Pro), telotroca (Tel), invaginación de la glándula de la concha (Igc) y periostraco (Per). Barra de escala 50 µm.

A las 41 horas post-fertilización (hpf), la larva trocófora se transformó en una larva D de entre 105 y 110 µm de longitud (Figura 4.37). La secreción de la glándula de la concha ha ido avanzando de izquierda a derecha hasta envolver la prodisoconcha I todo el cuerpo del individuo. Las valvas tenían un aspecto membranoso y aún no se habían calcificado totalmente. La charnela se mostraba como una línea continua dorsal de separación de las dos valvas (Figura 4.39).

En la larva D, la telotroca se transformó en un mechón post-anal y la prototroca evolucionó hasta constituir una corona de cilios oval denominada velo. En él se diferencian 3 bandas concéntricas de cilios de diferente tamaño, observándose de exterior a interior una banda de cilios preorales, adorales y postorales (Figura 4.38).

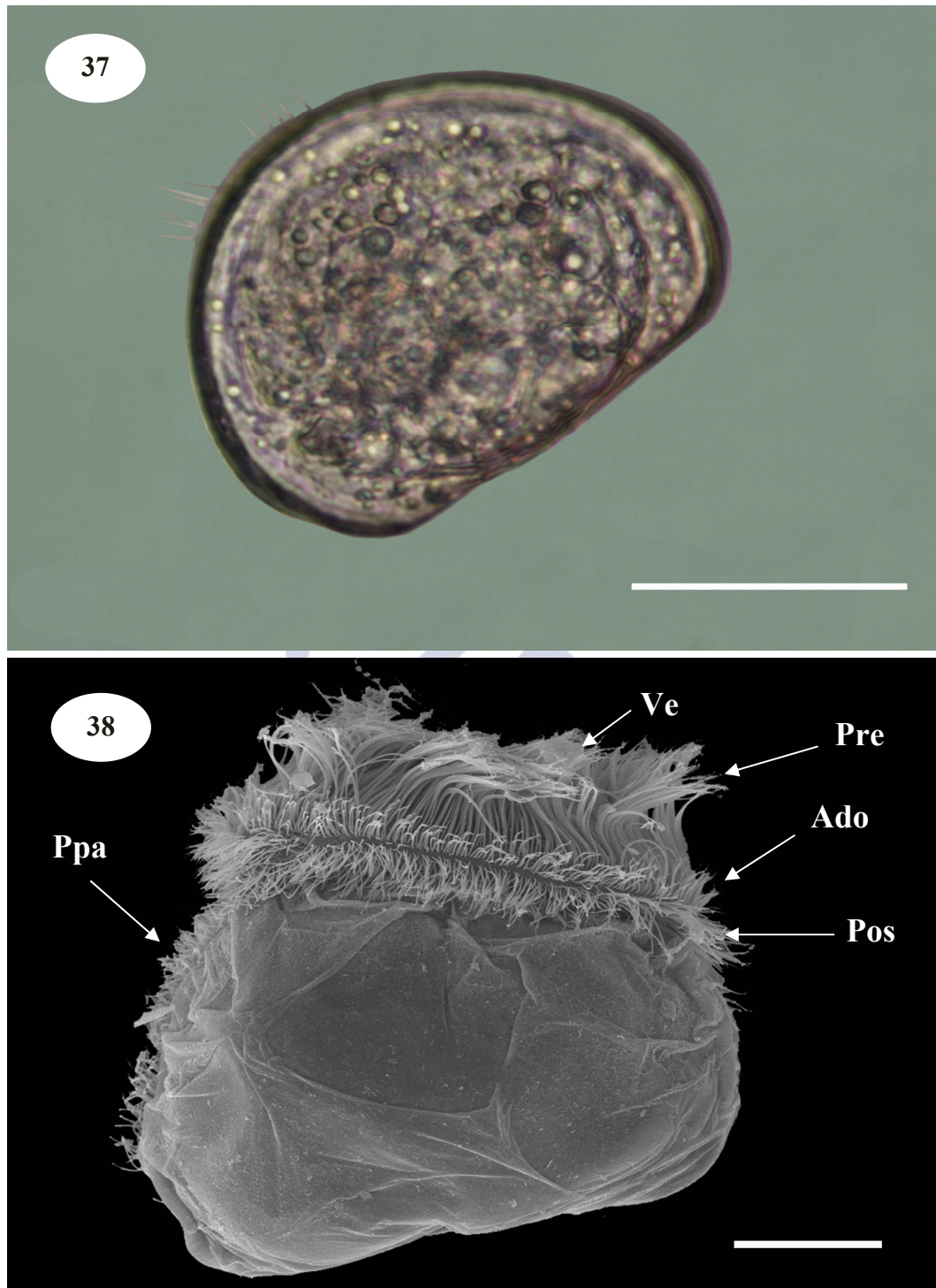


Figura 4. (37-38). 37) Larva D al microscopio óptico. Barra de escala 50 μm . 38) Imagen de larva D al microscopio electrónico de barrido (SEM) (41 hpf). Se diferencian el penacho post-anal (Ppa) y velo (Ve) con bandas de cilios preorales (Pre), adorales (Ado) y postorales (Pos). Barra de escala 20 μm .

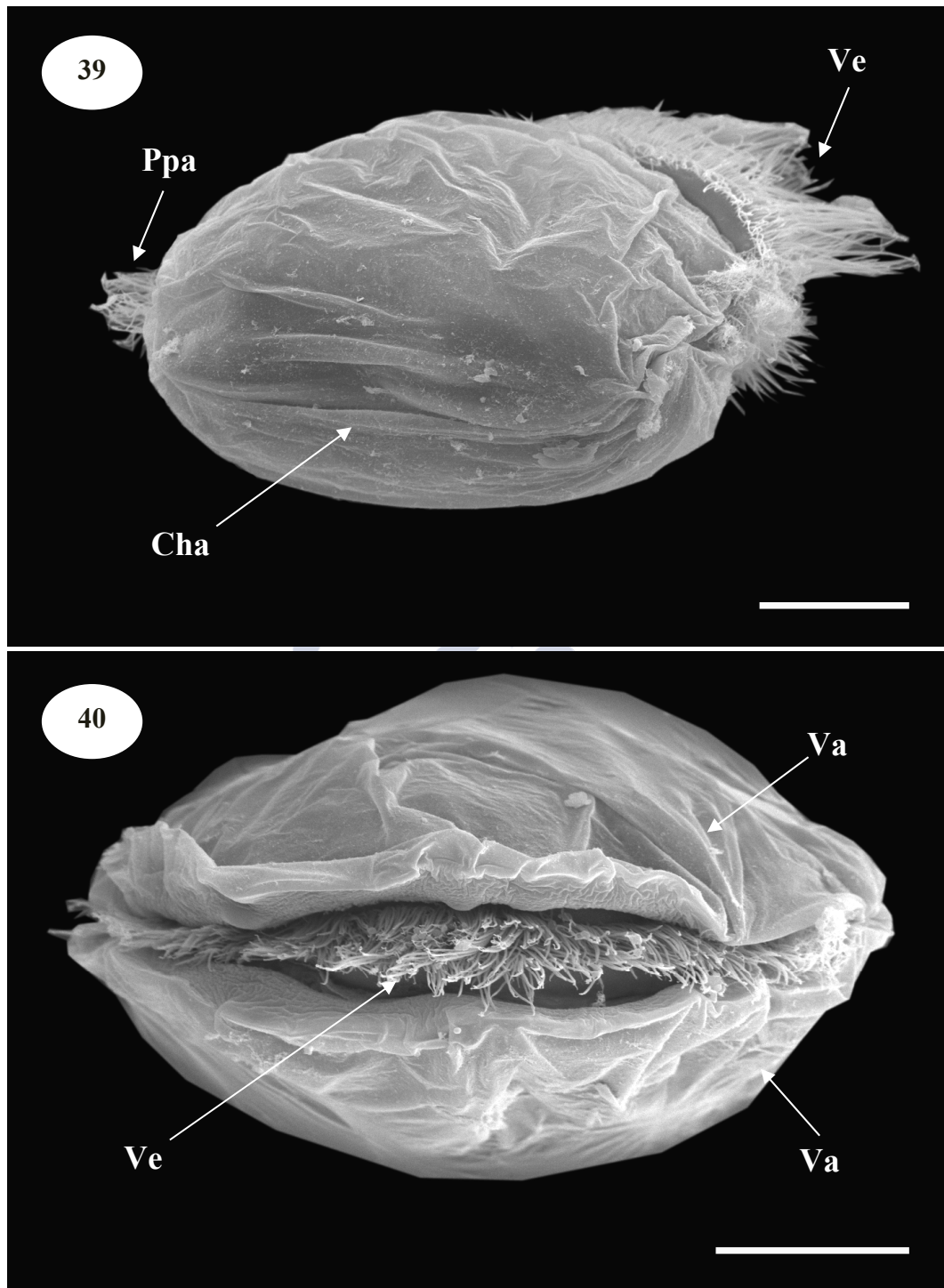


Figura 4. (39-40). Larva D al microscopio electrónico de barrido (SEM) (41 hpf). 39) Imagen dorsal de larva D. Se observan velo (Ve), penacho post-anal (Ppa) y charnela (Cha). 40) Visión frontal de larva D, se observan las dos valvas (Va) y el velo (Ve). Barras de escala 20 μ m.

En fases avanzadas de larva D, la prodisoconcha I envolvió en su totalidad el cuerpo del individuo. La calcificación de la concha larvaria fue completa a las 41 hpf (Figura 4.41).

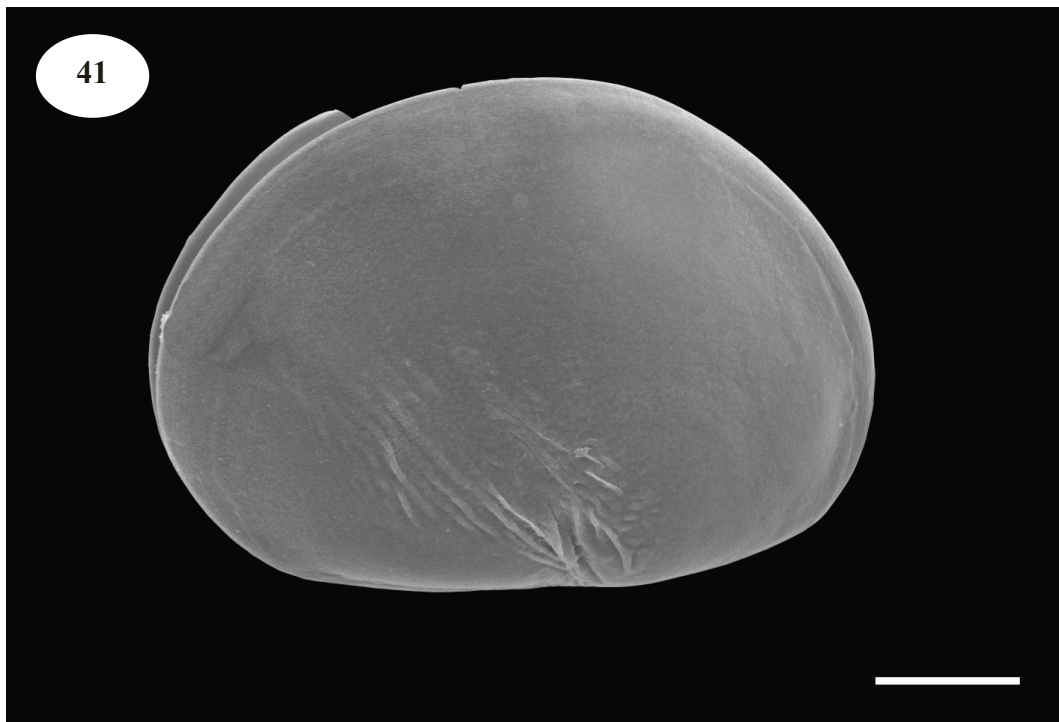


Figura 4.41. Larva D tardía al microscopio electrónico de barrido (SEM) (41 hpf). Barra de escala 20 μ m.

En las figuras 4.42-44, se observa con microscopía electrónica de transmisión, cómo las valvas se han desarrollado completamente. En la región anterior, a ambos lados, se aprecia la inserción de la concha al borde del manto. En la zona posterior, se muestran secciones del tracto digestivo y el penacho post-anal.

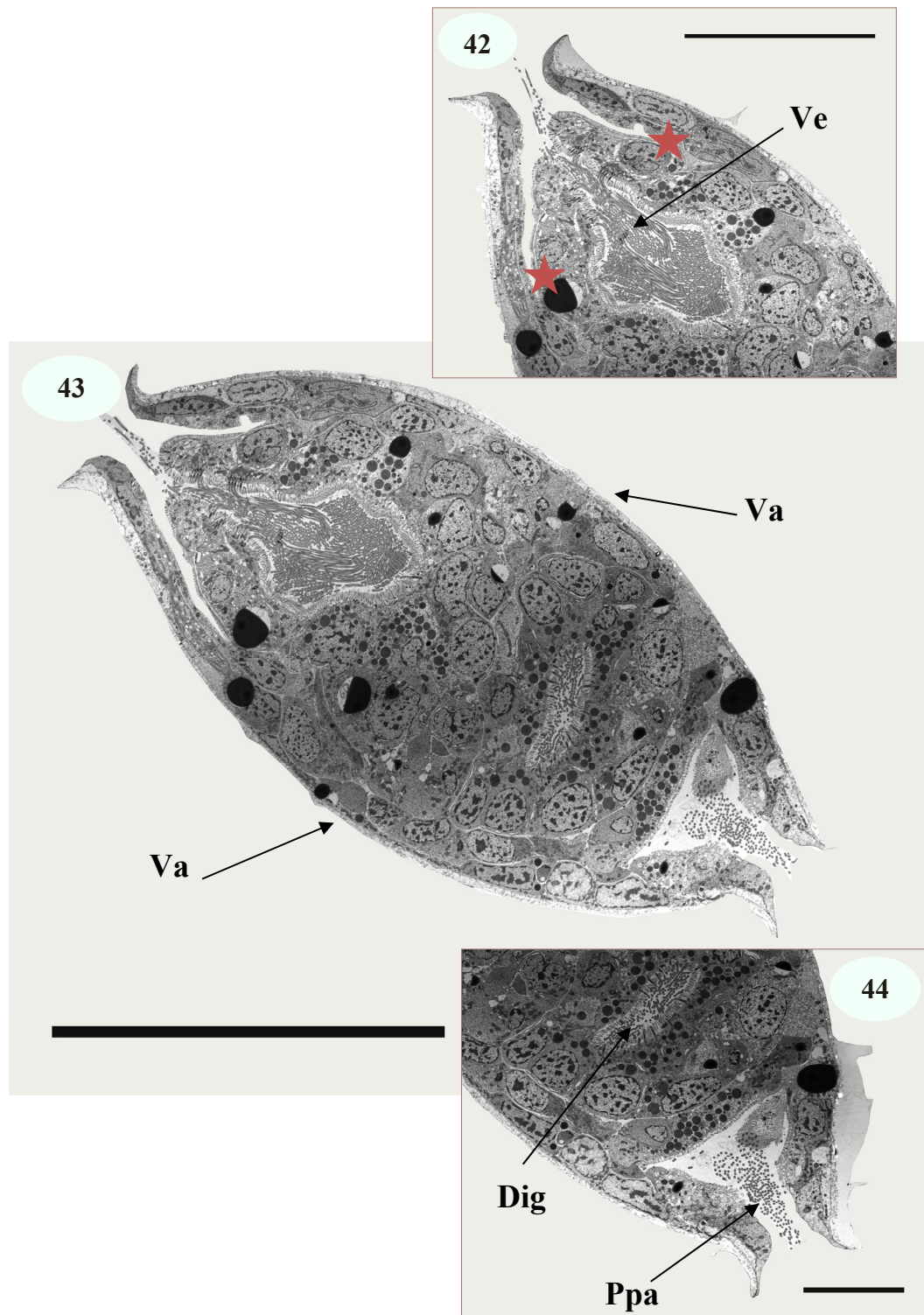


Figura 4. (42-44). Larva D al microscopio electrónico de transmisión (TEM) (41 hpf). 42) Detalle de la región anterior con inserciones de la concha al borde del manto (estrellas) y el velo retraído (Ve). Barra de escala 10 μ m. 43) Valvas (Va) encerrando el cuerpo de la larva. Barra de escala 40 μ m. 44) Detalle de la región posterior donde se diferencian el penacho post-anal (Ppa) y sección del tubo digestivo (Dig). Barra de escala 10 μ m.

A las 41 hpf se observó que las valvas de la larva D envolvieron por completo la región visceral uniéndose en su región dorsal para formar la charnela (Figura 4.45). A ambos lados de la charnela se ubicaban las células secretoras T1, adyacentes a ellas se encontraron las células T2, que secretan el ligamento, por último, se distinguieron las células T3, que contribuirán a la secreción de la matriz orgánica de la concha (Figura 4.46).

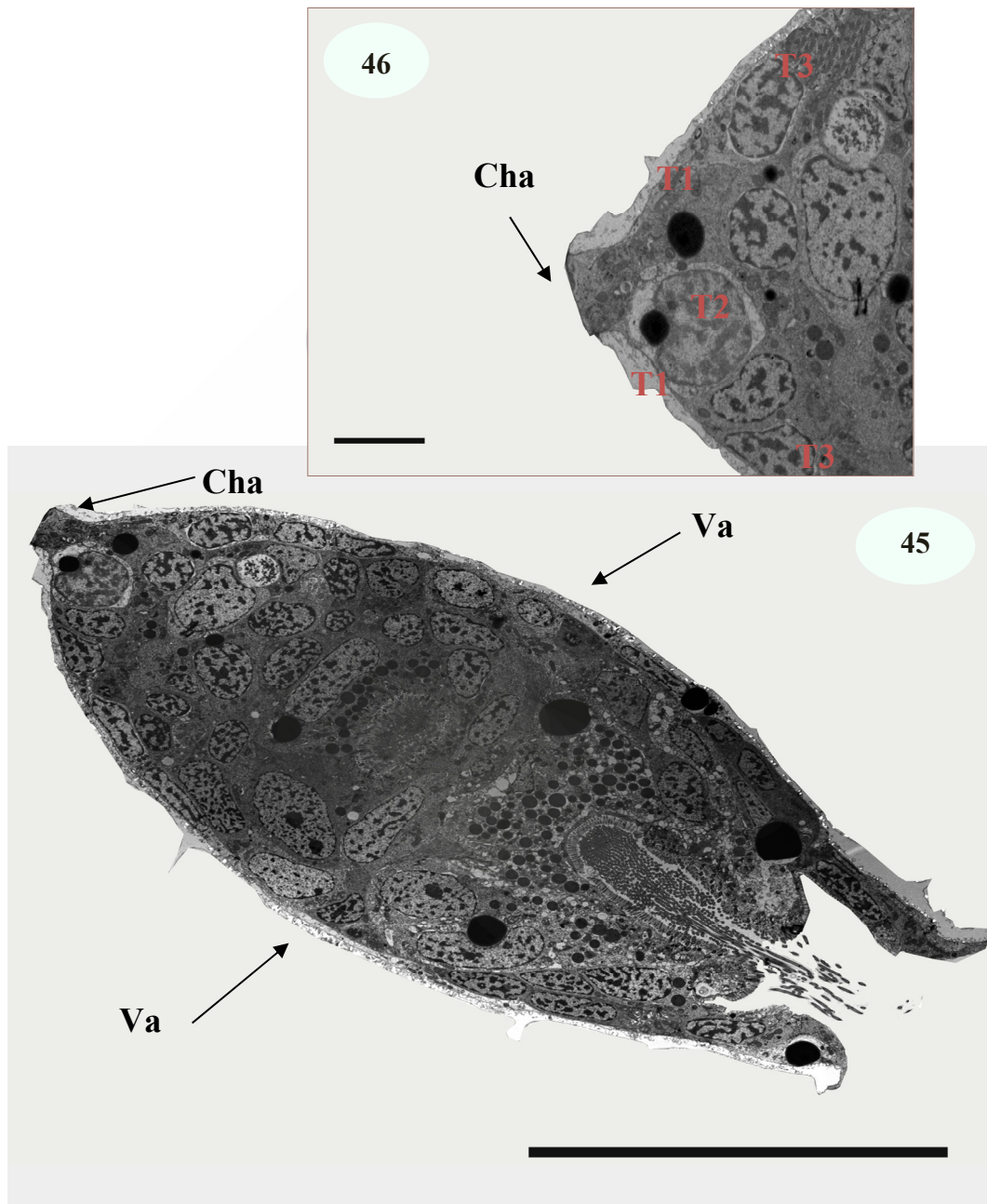


Figura 4. (45-46). 45) Larva D tardía envuelta por las dos valvas (Va) y charnela (Cha) formada en la región dorsal. Barra de escala 40 µm. 46) Detalle de la charnela (Cha) con tipos celulares T1, T2 y T3 (41 hpf). Barra de escala 5 µm.

4. Desarrollo embrionario y larvario

A los 8 días de cultivo, la larva comienza a perder la característica forma de “D” comenzando a arquearse por la zona donde se ubica la charnela, dando lugar a la larva umbonada que midió entre 130 y 170 μm (Figuras 4.47 y 48).

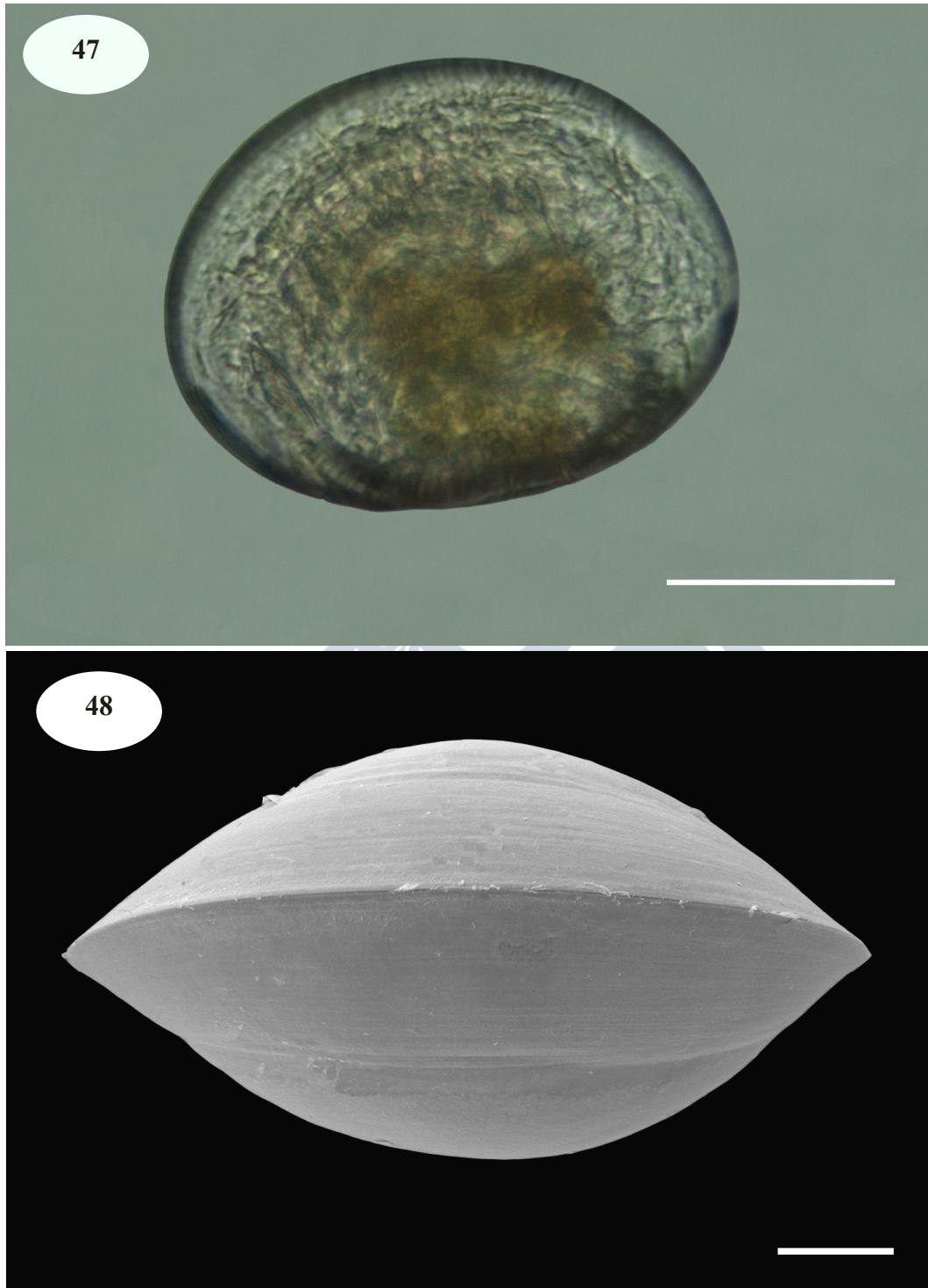


Figura 4. (47-48). 47) Larva umbonada al microscopio óptico. Barra de escala 50 μm . 48) Larva umbonada al microscopio electrónico de barrido (SEM). Barra de escala 20 μm .

En la fase umbonada la prodisoconcha I presentaba el característico aspecto punteado y se diferenciaba claramente de la prodisoconcha II con líneas concéntricas (Figuras 4.49; 50 y 51).

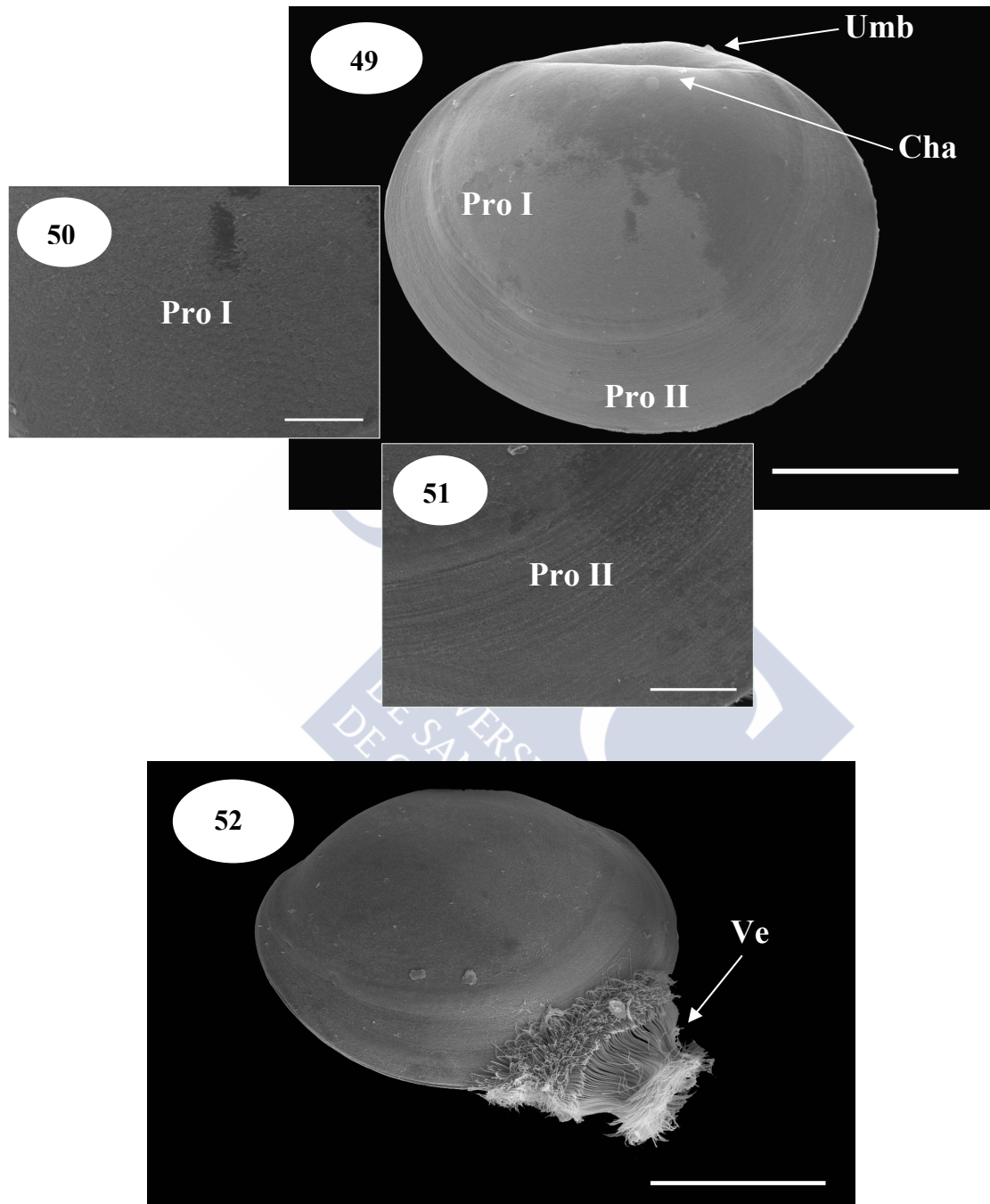


Figura 4. (49-52). 49) Larva umbonada al microscopio electrónico de barrido (SEM), se diferencian, umbo (Umb), charnela (Cha), prodisoconcha I (Pro I) y prodisoconcha II (Pro II). Barra de escala 50 μm . 50) Detalle de prodisoconcha I. Barra de escala 10 μm . 51) Detalle de prodisoconcha II (Pro II). Barra de escala 10 μm . 52) Larva umbonada con velo (Ve). Barra de escala 50 μm .

A los veintidós días de cultivo aproximadamente, apareció la larva pediveliger provista de pie y velo, ambos ciliados. Existe un penacho apical (Pa) en el velo que en estadios tempranos no es demasiado evidente pero en esta etapa, se diferencia por su longitud y se mantuvo hasta la pérdida total del velo (Figura 4.53).

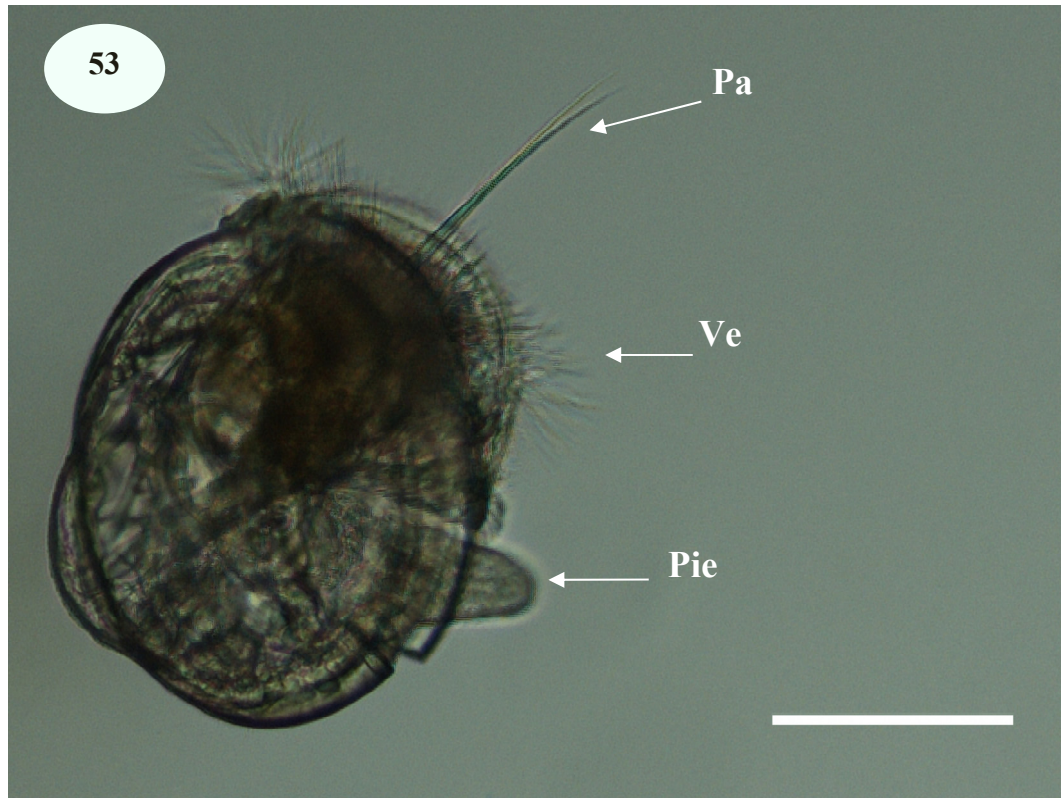


Figura 4.53. Larva pediveliger al microscopio óptico. Se observan pie (Pie), velo (Ve) y penacho apical (Pa). Barra de escala 100 μ m.

La talla de la larva pediveliger osciló entre 200 y 250 μ m y en ella las líneas concéntricas de la prodisoconcha II aparecían más marcadas (Figuras 4.54, 55 y 56). Durante esta etapa, las larvas alternan una vida planctónica con reptación sobre sustrato (vida bentónica).

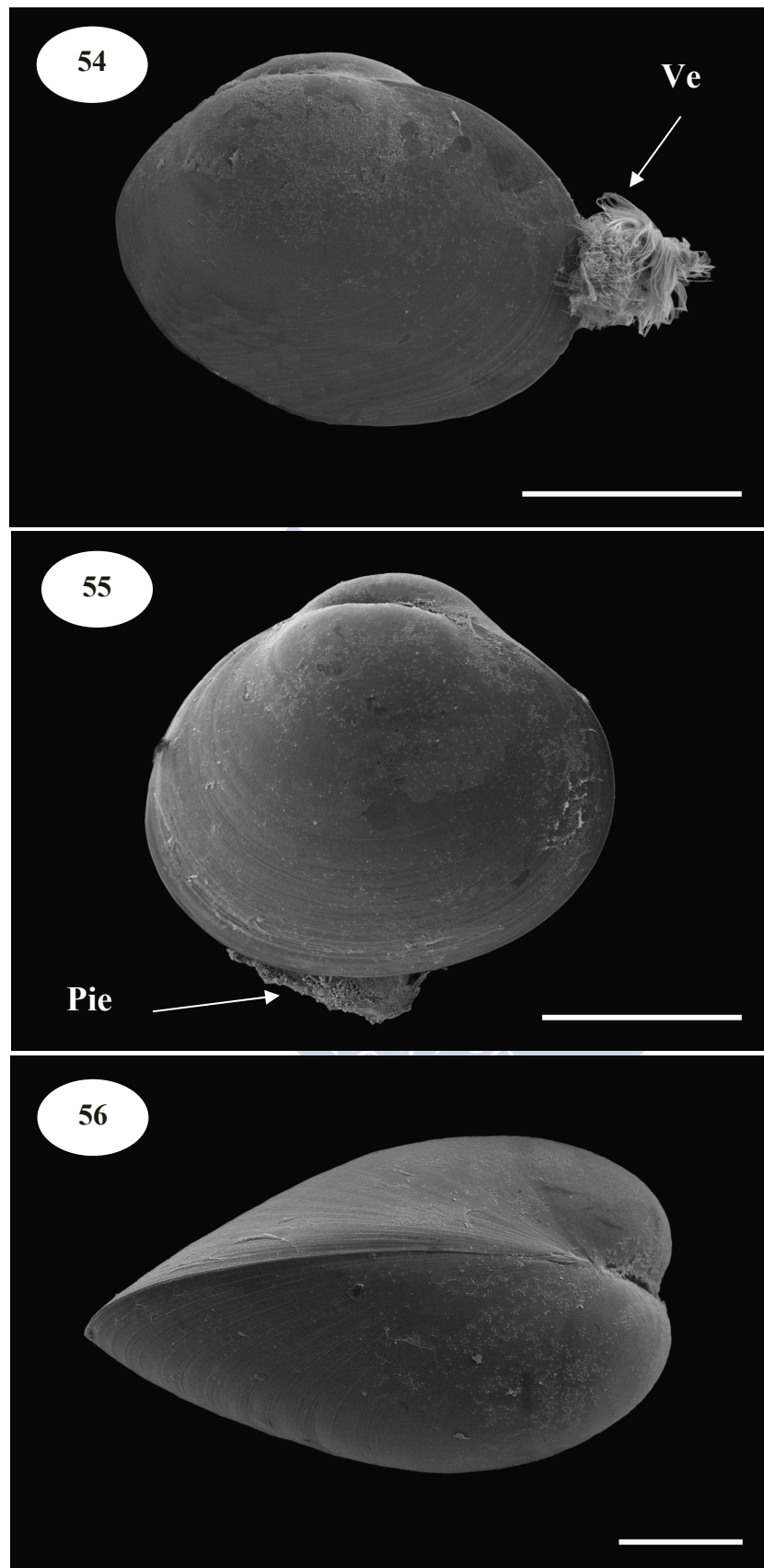


Figura 4. (54-56). Larva pediveliger al microscopio electrónico de barrido (SEM). 54) Pediveliger mostrando el velo (Ve). Barra de escala 100 μ m. 55) Pediveliger mostrando el pie (Pie). Barra de escala 100 μ m. 56) Vista lateral. Barra de escala 50 μ m.

4. Desarrollo embrionario y larvario

Aproximadamente un mes después de la fertilización, se originó la postlarva con talla comprendida entre 250 y 300 μm . A partir de este momento, la coquina empieza una vida estrictamente bentónica. La metamorfosis comienza con la reabsorción del velo y la formación de las branquias (Figura 4.57). El pie apareció más desarrollado y tapizado en su totalidad por microvellosidades (Figuras 4.58; 59 y 60). Con microscopía electrónica de barrido, se observaron órganos internos como las branquias, reborde del manto (Rma) o el músculo aductor (Ma).

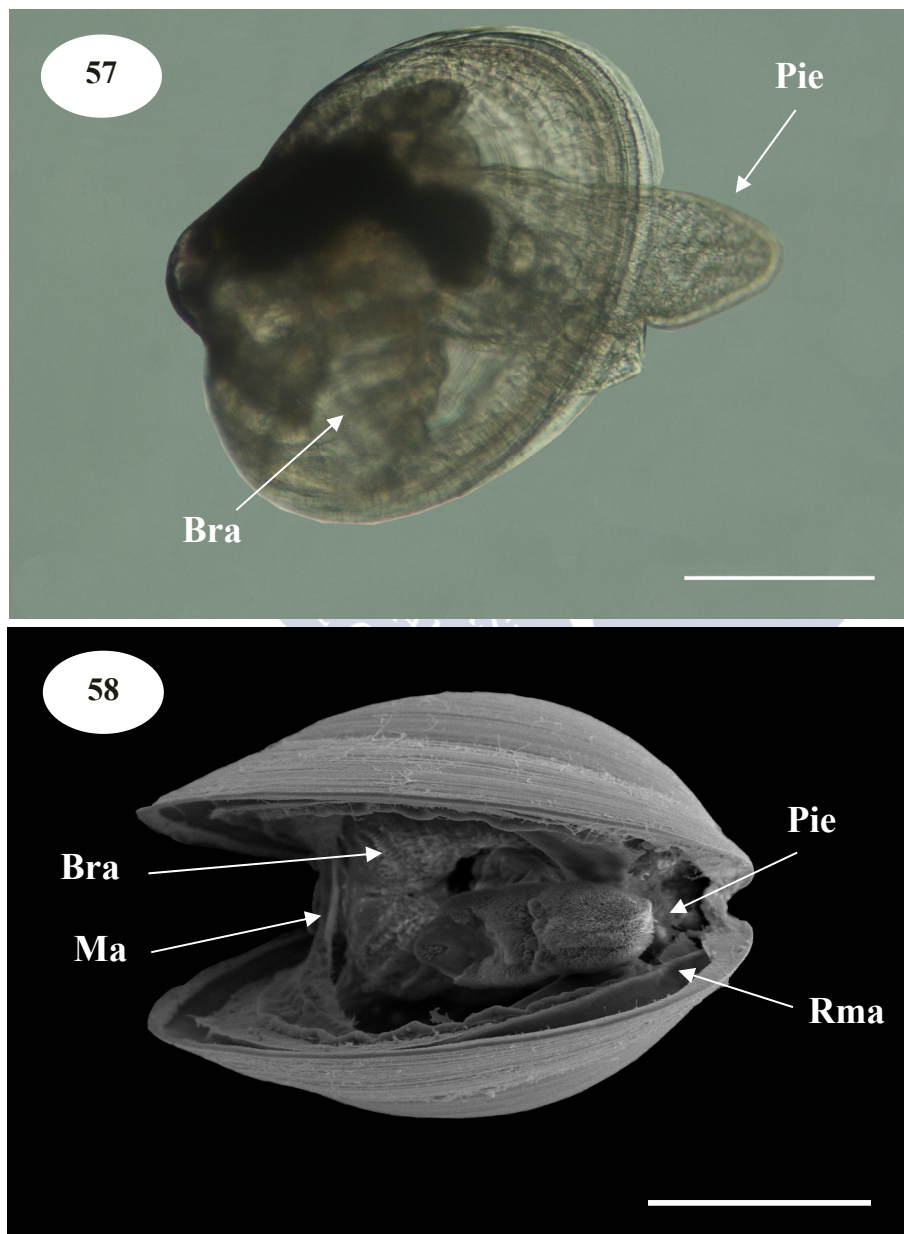


Figura 4. (57-58). 57) Postlarva al microscopio óptico. Se observan pie (Pie) y branquia (Bra). 58) Postlarva al microscopio electrónico de barrido (SEM). Se diferencian pie (Pie), branquia (Bra), músculo aductor (Ma) y reborde muscular del manto (Rma). Barras de escala 100 μm .

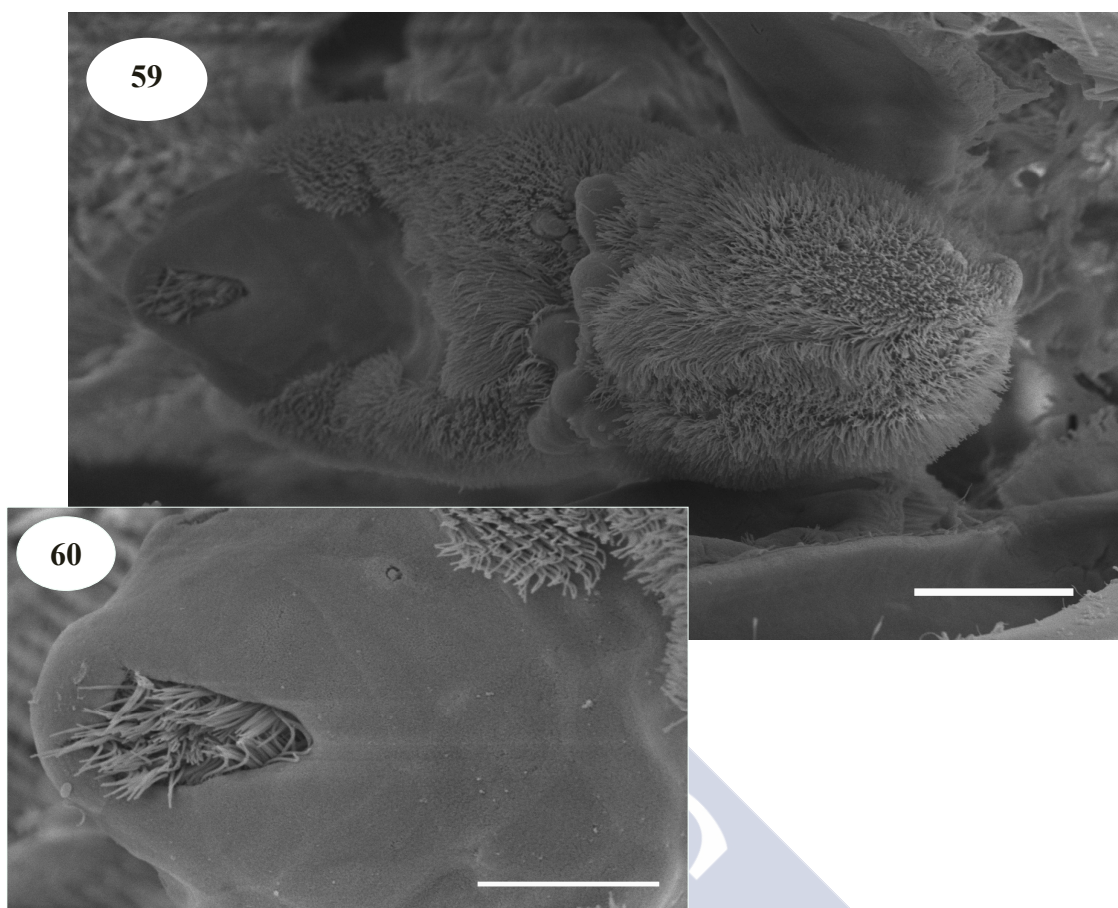


Figura 4. (59-60). Fotografías de postlarva al microscopio electrónico de barrido (SEM). 59) Pie. 60) Detalle de la región basal del pie. Barras de escala 20 y 10 μm , respectivamente.

En la postlarva, el crecimiento de la prodisoconcha II desplaza a la prodisoconcha I hacia la región dorsal para pasar a formar parte del umbo, esta presenta un aspecto punteado y tamaño proporcionalmente menor que en estadíos anteriores; la prodisoconcha II se localiza en posición intermedia y, en posición exterior, se origina la disoconcha secretada por el lóbulo del manto (Figuras 4.61; 62 y 63). La disoconcha se caracteriza por presentar anillos concéntricos fuertemente marcados (Figura 4.63).

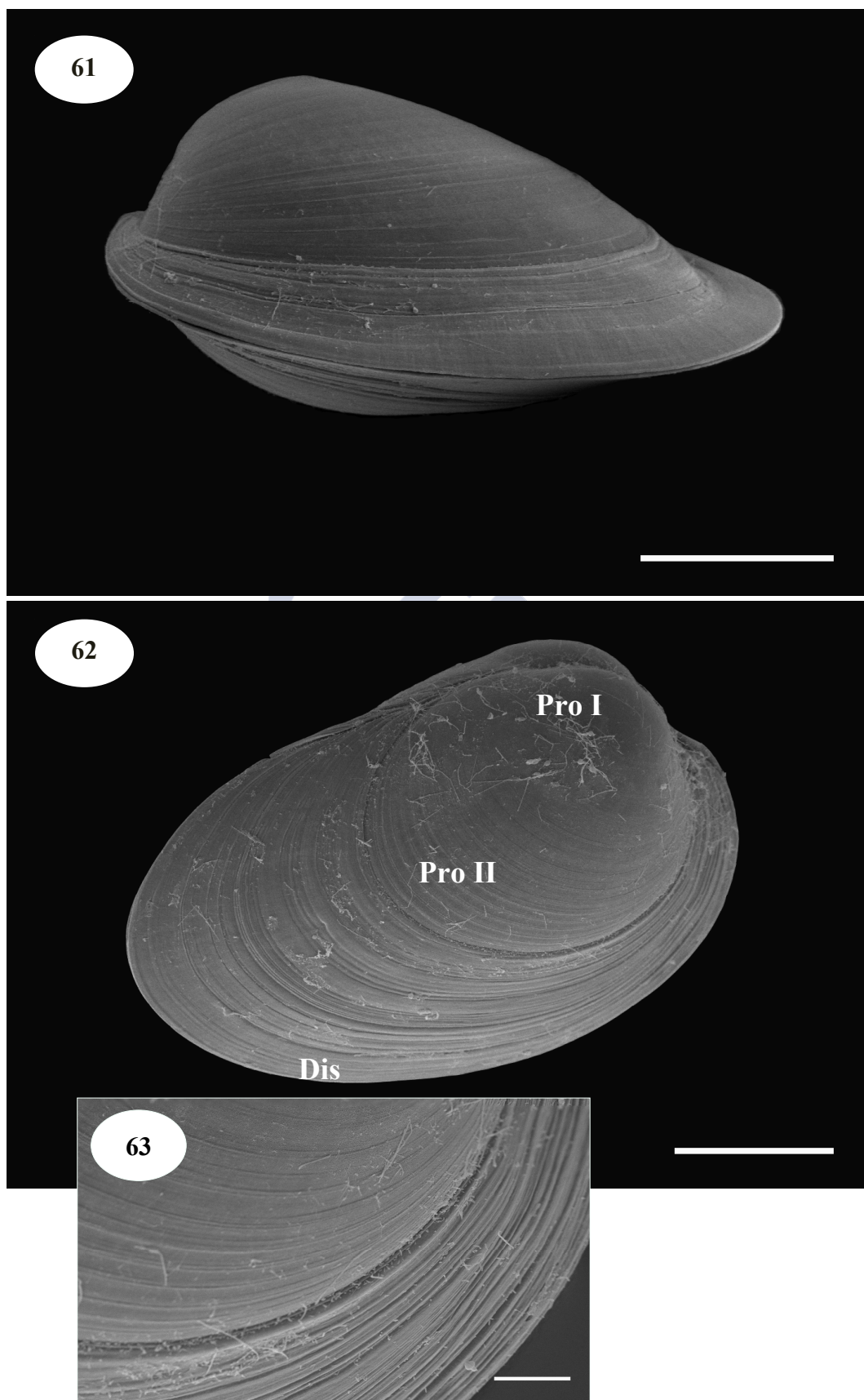


Figura 4. (61-63). Fotografías de postlarva al microscopio electrónico de barrido (SEM). 61) Visión lateral. 62) Prodisoconcha I (Pro I), prodisoconcha II (Pro II) y disoconcha (Dis). Barras de escala 100 μm . 63) Detalle de la disoconcha. Barra de escala 20 μm .

4.4. DISCUSIÓN

El desarrollo larvario se ha descrito en varias especies de la familia Donacidae, sin embargo, el estudio de los desarrollos embrionario y larvario de la especie *D. trunculus*, mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM), nunca se había realizado con anterioridad.

El ovocito de *D. trunculus* sin fecundar, tiene un diámetro medio de entre 75 y 85 μm , superior al de otras especies de bivalvos como *D. obesulus* (59 μm) (Carstensen *et al.*, 2010); *Chione cancellata* (60 μm) (Moñeiza *et al.*, 2006); *Ensis magnus* (71 μm) (da Costa *et al.*, 2008); *Venerupis corrugata* (74 μm) (Cerviño-Otero *et al.*, 2008); *Ruditapes philippinarum* Adams & Reeve, 1850 (65-70 μm) (Martínez *et al.*, 2008); *Politapes rhomboides* Pennant, 1777 (70 μm) (Martínez *et al.*, 2011) o *Ruditapes decussatus* (68 μm) (Aranda-Burgos, 2010), sin embargo, es de talla inferior a *Solen marginatus* cuyo ovocito tiene un tamaño de entre 140 y 150 μm (da Costa, 2009).

El conjunto de cabeza y pieza intermedia del espermatozoide mide 4,4 μm de longitud, encontrando Bozzo *et al.* (2008) una talla similar en las mismas estructuras. En *D. vittatus*, el tamaño es de 4 μm (Frenkiel y Moñeiza, 1979) siendo superior en *D. obesulus* (5 μm) (Carstensen *et al.*, 2010) y en *D. variabilis* (6 μm) (Chanley, 1969). La cabeza del espermatozoide de *D. trunculus*, presenta en la base cuatro mitocondrias esféricas al igual que *Hemidonax pictus* (Tryon, 1870) y *Donax (Plebidonax) deltoides* Lamarck, 1818 (Healy *et al.*, 2008). Los espermatozoides de *Donax madagascariensis* W. Wood, 1828, *Donax sordidus* Hanley, 1845 y *Donax serra* Röding, 1798, constan de una cabeza de 2 μm , una región intermedia con 4 mitocondrias y una cola (Hodgson *et al.*, 1989). En otras especies, como *V. corrugata*, el tamaño de la región de la cabeza es prácticamente igual (4 μm) (Cerviño-Otero, 2011) y muy inferior en *Chione cancellata* (1 μm) (Moñeiza *et al.*, 2006). El espermatozoide de *D. trunculus* es de forma cilíndrica, al igual que el de *V. corrugata* (Cerviño-Otero, 2011), esta característica lo diferencia del espermatozoide de *R. decussatus* Linnaeus, 1758 mucho más alargado y curvo (Aranda-Burgos *et al.*, 2014b).

Los estadios de 2, 4, 8, 16, 32 y 64 células presentan tiempos de transformación similares a otros bivalvos de interés comercial en Galicia tales como, *E. magnus* y *E. siliqua* (da Costa *et al.*, 2008; da Costa, 2009), *R. decussatus* (Aranda-Burgos, 2010) o *V. corrugata* (Cerviño-Otero, 2011).

La blástula en *D. trunculus*, aparece a las 7 h y 20 min post-fertilización, algo después que las especies antes citadas, a excepción de la navaja, que se transforma entre las 8 y 12 horas posteriores a la fecundación.

La gástrula aparece a las 9 horas post-fertilización. La gastrulación tiene lugar por epibolia, al igual que en otros moluscos bivalvos como los pertenecientes al género *Ensis* (da Costa *et al.*, 2008; da Costa, 2009); *Crassostrea*, *Mytilus*, *Ostrea*, *Pecten*, *Venus* (Verdonk y Van den Biggelaar, 1983) o los venéridos *R. decussatus* (Aranda-Burgos, 2010) y *V. pullastra* (Cerviño-Otero, 2011). En el estadio de gástrula ya se distinguen dos invaginaciones, blastoporo e invaginación de la glándula de la concha en polos opuestos. Con microscopía electrónica de transmisión (TEM), en la transición de la gástrula tardía a larva trocófora, se diferencian en la invaginación de la glándula de la concha células T1 secretoras, que comienzan a depositar material desapareciendo en las zonas de depósito la superficie ciliar, como ocurre también en gástrulas tardías de la almeja fina (Aranda-Burgos *et al.*, 2014b).

La larva trocófora, piriforme y ciliada, aparece a las 15 horas después de la fertilización, el tiempo de aparición es parecido al de especies como la almeja fina (Aranda-Burgos, 2010); almeja babosa (Cerviño-Otero, 2011) y el longueirón (da Costa *et al.*, 2011a). En este estadio la larva presenta gran movilidad facilitada por una corona denominada prototroca, que la divide en dos partes desiguales.

En la larva trocófora, la invaginación de la glándula de la concha se localiza debajo de la prototroca. En larvas trocóforas tardías, esta secreción de aspecto membranoso, se expande en ambas direcciones quedando unida en su región basal por una línea que constituirá la futura charnela. El periostraco terminará envolviendo el cuerpo del individuo formándose la larva D a las 41 horas post-fertilización, en este momento, se observaron en la muestra algunos individuos con la concha totalmente calcificada, aunque será necesario más tiempo para que, al menos el 50% de la

población, alcance este estado. En *E. siliqua*, a las 38 hpf, la concha en la larva D, se encuentra totalmente calcificada (da Costa *et al.*, 2011a), en *V. corrugata* tendrán que pasar 48 h desde la fecundación para observar la prodisoconcha I totalmente calcificada (Cerviño-Otero, 2011).

El tiempo que tarda en transformarse la larva trocófora en larva D, es superior en la coquina que en otras especies como la almeja fina (26 h) (Aranda-Burgos, 2010) o almeja babosa (30-32 h) (Cerviño-Otero, 2011).

La formación de la concha es un importante paso en la organogénesis de bivalvos (Raleigh y Keegan, 2007). Los primeros estudios en relación a esta temática fueron descritos para especies de gasterópodos y proponen un modelo que considera necesaria la total oclusión de la invaginación de la glándula de la concha para comenzar la secreción del periostraco. Kniprath (1980) en *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 y Casse *et al.* (1998) en *Pecten maximus*, apoyan esta hipótesis. En la especie *D. trunculus*, sin embargo, el modelo de formación de la primera concha larvaria se ajusta al modelo descrito por Moñeiza *et al.* (2006) en *Chione cancellata*, según el cual no se producirá una completa oclusión de la invaginación de la glándula de la concha para comenzar a secretar el periostraco. Este mismo modelo se describe en otras especies de bivalvos, como es el caso de *E. siliqua* (da Costa *et al.*, 2011a), *V. corrugata* (Cerviño-Otero, 2011) y *R. decussatus* (Aranda-Burgos *et al.*, 2014b), lo cual permite asegurar que, a pesar de pertenecer a familias distintas, todas ellas comparten el mismo patrón. En la coquina, al igual que en *C. cancellata*, se diferencian tres tipos celulares: células T1 secretoras del periostraco, células T2 secretoras del ligamento y células T3 que participarán en la secreción de la matriz orgánica de la concha.

La presencia del velo es algo característico de la larva D, está provisto de cilios que le permitirán realizar una captura de alimento exógena. En este trabajo se observaron 3 bandas de cilios: preorales, adorales y postorales, que también son descritos por Cerviño-Otero (2011) en *V. corrugata*. En *D. trunculus*, al comenzar la alimentación exógena, la prodisoconcha I (de aspecto punteado) crece, dando paso a la aparición en el estadio de larva umbonada a la prodisoconcha II.

La larva umbonada aparece 8 días después de la fertilización, un poco antes que en *D. vittatus*, que tarda entre 10 y 12 días (Frenkiel y Moñeza, 1979). La prodisoconcha II, al igual que en *R. decussatus* y *V. corrugata* (Aranda-Burgos, 2010; Cerviño-Otero, 2011), presenta aspecto rayado en forma de círculos concéntricos.

El pie en *D. trunculus*, aparece después de las dos semanas de cultivo, estando más del 50% de las larvas en este estadio pediveliger entre los 20 y 22 días, lo mismo ocurre en las especies *D. vittatus* (Frenkiel y Moñeza, 1979) y *D. obesulus* (Chanley, 1969).

Cuando la coquina se transforma en postlarva, un mes después de la fertilización, comienza una vida completamente bentónica. En esta etapa, el velo ha desaparecido por completo y el pie aparece más desarrollado y tapizado de microvellosidades, en *Ostrea edulis* Linnaeus, 1758 (Cranfield, 1973) describe la existencia de un pie recubierto por un epitelio ciliado; también son patentes en este estadio órganos internos como el caso de las branquias y otras estructuras, como el reborde del manto o músculos aductores.

La postlarva se forma en la coquina más tarde que en otras especies de interés comercial en Galicia como *S. marginatus* y *E. siliqua* (Martínez, 2002; da Costa y Martínez-Patiño, 2009; da Costa *et al.*, 2010b), *E. arcuatus* (da Costa *et al.*, 2008) o *V. corrugata* (Cerviño-Otero, 2011), teniendo lugar su origen casi al mismo tiempo que *R. decussatus* y *R. philippinarum* (Adams & Reeve, 1850), (Martínez *et al.*, 2008).

5. Capítulo III. Cultivo en criadero y en el medio natural





5. CAPÍTULO III. CULTIVO EN CRIADERO Y EN EL MEDIO NATURAL

5.1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una importante actividad que posibilita un incremento en la producción de moluscos, ya que permite una recuperación en aquellos bancos naturales afectados por fenómenos de sobreexplotación, enfermedades u otros motivos que conllevan a una regresión del recurso. La creciente demanda de mercado, convierte el cultivo de moluscos bivalvos de interés comercial tales como la coquina, *Donax trunculus*, en una actividad económica rentable e innovadora.

D. trunculus, es una especie de molusco bivalvo que supone un recurso económico importante para el sector marisquero de Galicia y cuyos bancos, en la actualidad, están en regresión. El desarrollo del cultivo en criadero de la coquina, como estrategia para la obtención de semilla, con fines de repoblación para aumentar la producción, constituye un claro beneficio para el sector. Actualmente, solo entre el 2% y 3% de la producción europea de moluscos procede del cultivo a partir de semilla obtenida en criadero, lo que indica un enorme potencial a la hora de sustituir progresivamente los probables déficits de semilla reclutada en el medio natural (Guerra, 2009).

Los primeros trabajos en relación al cultivo en criadero de bivalvos, se iniciaron en los laboratorios de Milford (EEUU) por el equipo de Loosanoff y en Conway (Reino Unido) con los estudios de Walne. Sus trabajos esencialmente consistían en determinar los parámetros óptimos que favorecían el éxito del cultivo y entre las especies que cultivaron se encuentran: *Ostrea edulis*; *Crassostrea gigas* Thunberg, 1793; *Mytilus edulis* y *Ruditapes philippinarum*. Estos trabajos, recopilados en dos publicaciones (Loosanoff y Davis, 1963; Walne, 1966), obtuvieron resultados reproducibles que permitieron aplicar la tecnología al cultivo de especies de bivalvos y pasar de una escala experimental a un nivel industrial de producción en criaderos.

En la década de los 70 se constituyeron los primeros criaderos industriales para el cultivo de bivalvos en Galicia. Entre los años 1972 y 1975 se realiza un programa de investigación conjunta entre el Instituto Español de Oceanografía y el Plan de Explotación Marisquera de Galicia, donde se estudian las posibilidades de cultivo en criadero de las especies de bivalvos de mayor interés comercial. En este trabajo se realizan las primeras experiencias de cultivo de *Venerupis corrugata*, *Ruditapes decussatus* y *O. edulis* (Pérez Camacho *et al.*, 1977).

La Administración Pública, ubica un criadero en Ribadeo a finales de esta década. Desde 1978 se vienen realizando en esta instalación cultivos larvarios, postlarvarios y de semilla de especies de moluscos bivalvos hasta una talla adecuada para su traslado al medio natural (Guerra, 1979). Los primeros trabajos se hicieron con la ostra plana (*O. edulis*) y la almeja fina (*R. decussatus*), posteriormente basándose en la técnicas empleadas para estas especies, y con adaptaciones en cada caso, se han cultivado otras de interés comercial en Galicia.

En la actualidad, en el Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo se cultivan las siguientes especies: almeja babosa (*V. corrugata*), almeja fina (*R. decussatus*), almeja japonesa (*R. philippinarum*), almeja rubia (*Polititapes rhomboides*), coquina (*D. trunculus*), navaja (*Ensis magnus*), longueirón (*Ensis siliqua*), longueirón vello (*Solen marginatus*) y erizo (*Paracentrotus lividus* Lamarck, 1816) (Martínez *et al.*, 2008). Los primeros estudios relacionados con el cultivo de la coquina datan de los años 80 y son recogidos en el trabajo de tesina de Fernández Otero (1982). A partir de esta fecha, se continuó cultivando la especie en criadero, Martínez *et al.* (1993, 2003) y en el marco de un proyecto financiado por la Junta Nacional de Cultivos Marinos (JACUMAR, 2006-2009), se realizaron experiencias en el criadero para optimizar su cultivo.

Las técnicas empleadas en los criaderos son conocidas, sin embargo, es necesario abordar diversas problemáticas que se plantean en las diferentes etapas de los cultivos.

Los estudios encaminados a la optimización de cada fase del cultivo en los bivalvos se centran en aspectos tales como alimentación (Albentosa *et al.*, 1993; Louzán *et al.*, 2011b; Aranda-Burgos *et al.*, 2014a); acondicionamiento (Martínez *et al.*, 2000;

Martínez y Pérez, 2003; Matias *et al.*, 2008; Ojea *et al.*, 2007, 2008; Louzán *et al.*, 2011a); cultivo larvario (Ruiz-Azcona *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 2001, 2002, 2008; Cerviño Otero, 2005; Nóvoa, 2007; Louzán *et al.*, 2008, 2009; Márquez *et al.*, 2009; da Costa *et al.*, 2011b; Aranda-Burgos *et al.*, 2010, 2014a; Prado *et al.*, 2009); cultivo postlarvario y de semilla (da Costa y Martínez-Patiño, 2009; da Costa *et al.*, 2010 a y b; Cerviño Otero, 2011) y adaptación de semilla al medio natural (da Costa y Martínez-Patiño, 2009; Louzán *et al.*, 2010; Cerviño Otero, 2011).

El diseño de los criaderos de moluscos varía en función de las especies cultivadas y sobre todo, de los objetivos de producción, a pesar de esto, los elementos básicos son los mismos para cualquier criadero de bivalvos. Incluyen una zona para mantener y acondicionar los reproductores, una zona para cultivar las larvas, otra para el cultivo de postlarvas, un área para mantener la semilla hasta una talla adecuada y unas instalaciones para la producción de fitoplancton a pequeña y gran escala.

Dentro de un criadero, cabe destacar el cultivo de fitoplancton ya que es la base de la alimentación en los bivalvos, tanto en sus fases larvarias como en los juveniles y progenitores. Los tratamientos a los que se somete el agua que se utilizará en el criadero eliminan el fitoplancton natural existente, por este motivo y con el objetivo de aumentar la cantidad y concentración del alimento, se incorporan microalgas cultivadas para satisfacer las necesidades nutritivas.

La calidad y cantidad de alimento que se suministra, son parámetros importantes en el éxito de las distintas fases del cultivo, además de que tengan un tamaño adecuado para ser ingeridas en función de la fase de cultivo de los moluscos, generalmente entre 2 y 12 μm , el valor nutricional de las microalgas y la digestibilidad son aspectos importantes en la elección de las especies que se van a suministrar en la dieta. Diversos estudios han demostrado que la calidad de la dieta microalgal tiene una influencia directa en el crecimiento y desarrollo de especies de moluscos bivalvos, como por ejemplo *Pecten maximus* (Delaunay *et al.*, 1993; Soudant *et al.*, 1996); *C. gigas* (Knauer y Southgate, 1997; Soudant *et al.*, 2005); *O. edulis* (Berntsson *et al.*, 1997); *V. corrugata* (Nóvoa, 2007); *R. decussatus* (Albentosa *et al.*, 1996; Fernández-Reiriz *et al.*, 1989, 2006; Aranda *et al.*, 2014a) y *R. philippinarum* (Caers *et al.*, 1999). La utilización de dietas mixtas en los cultivos larvarios de bivalvos, es una práctica que está

reconocida como garantía de cubrir sus requerimientos nutritivos. Epifanio (1976) indica que, en larvas de bivalvos marinos, el empleo de dietas microalgales pluriespecíficas tiene un efecto sinérgico sobre su crecimiento y supervivencia.

Las especies más frecuentemente empleadas en el cultivo de moluscos bivalvos son: las diatomeas (*Chaetoceros calcitrans* (Paulsen) Takano, 1968; *Chaetoceros neogracile* S.L. VanLandingham, 1968; *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve, 1873 y *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin, 1897) y las flageladas (*Isochrysis galbana* Parke, 1949, *Isochrysis aff. galbana* (T-iso), *Diacronema lutheri* (Droop) Bendif & Véron, 2011 y *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butcher, 1959).

El fitoplancton se cultiva en agua de mar tratada y enriquecida con nutrientes adicionales como nitratos, fosfatos, oligoelementos esenciales, vitaminas y dióxido de carbono como fuente de carbono, además en el cultivo de las diatomeas se añaden silicatos.

El cultivo de fitoplancton puede realizarse en sistema discontinuo, donde se desarrolla hasta la fase exponencial y se cosecha todo el volumen y sistema continuo, que se basa en un aporte de agua con medio nutritivo, a la vez que tiene lugar la cosecha del cultivo con un flujo continuo. En el Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo, se combinan los dos tipos de cultivo, comenzando con el cultivo discontinuo en cámara, donde se obtendrán inóculos para abastecer al sistema de cultivo continuo. Con este último sistema, se pueden obtener elevadas densidades de producción y se mantiene una constancia en la cantidad y calidad nutritiva del fitoplancton (Fernández-Pardo, 2011).

Tras la recogida de progenitores en el medio natural y su traslado al criadero, comienza el proceso de cultivo. Dependiendo del estado de madurez de los individuos se siguen dos estrategias: si están maduros se hace una estabulación y mantenimiento de progenitores, por un corto período de tiempo, hasta que se obtenga el desove. En caso contrario, se realiza el acondicionamiento de progenitores, que consiste en el mantenimiento de los mismos en unas condiciones que favorezcan y aceleren el proceso de maduración.

En este trabajo, fueron dos los objetivos fundamentales en el acondicionamiento de la coquina: el primero, favorecer el desarrollo gonadal de la especie fuera de su período natural (marzo-julio), de este modo se amplía el período de puesta y se puede obtener semilla de una talla adecuada para su traslado al medio natural en meses de primavera o verano evitando los meses de invierno, momento en que las temperaturas y condiciones del medio dificultan su crecimiento y supervivencia. El segundo objetivo, es el mantenimiento de reproductores en criadero para la obtención de sucesivos desoves.

Una vez que los reproductores están maduros, el siguiente paso es conseguir que desoven. Las puestas se pueden obtener de una forma espontánea, pero en ocasiones, es necesario hacer una inducción a la puesta o “spawning” que consiste en la estimulación de ejemplares adultos maduros para provocar la liberación de gametos (ovocitos en el caso de las hembras y espermatozoides en los machos) al exterior donde tendrá lugar la fecundación. Los estímulos de tipo natural minimizan el estrés en los adultos. El método físico de choques térmicos, es el más utilizado en las especies de moluscos bivalvos dioicos puesto que resulta ser efectivo y menos agresivo para los reproductores y los gametos obtenidos, ya que generalmente, esta inducción funciona cuando los ovocitos están totalmente maduros. Junto a este método, se pueden emplear estímulos adicionales como son el extracto de gónada, huevos o esperma obtenidos de algunos ejemplares que ya los hayan expulsado o bien la adición de fitoplancton.

El choque térmico fue utilizado en *V. corrugata*, *Polititapes aureus* (Gmelin, 1791) (Le Pennec, 1970) y en *R. decussatus* (Ojea *et al.*, 2008), la adición de gametos, en *C. gigas* y *C. virginica* (Galtstoff, 1930) y el efecto combinado de los cambios de temperatura y la adición de gametos en especies como *C. gigas* (Loosanoff, 1954), *V. corrugata* (Nóvoa, 2007; Cerviño Otero, 2011), *R. decussatus* (Aranda-Burgos, 2010), *E. siliqua* y *S. marginatus* (Martínez, 2002; da Costa y Martínez-Patiño, 2009; da Costa *et al.*, 2010b).

En cuanto a los estímulos químicos, consisten en la inyección de serotonina y otros compuestos directamente en la gónada de los bivalvos. Los gametos expulsados, después de este tipo de inducción, son a menudo menos viables ya que se puede ver forzada la expulsión de aquellos que no estén totalmente maduros.

En varias especies de *Donax* se utilizó como estímulo químico la inyección de NH_4OH en gónada: Chanley (1969) lo emplea en *D. variabilis*; en *D. trunculus* se utilizó a una concentración del 3% (Moüeza, 1975) y en *D. vittatus* resulta efectiva la inyección en gónada de una solución a una concentración de un 5% (Frenkiel y Moüeza, 1979).

Generalmente se hace el “spawning” con separación de sexos, una vez que los individuos empiezan a emitir sus gametos se hace separación de machos y hembras, todos los ovocitos expulsados se fertilizan añadiendo solo una pequeña cantidad de esperma.

El “spawning” en masa, es un método más simple pero menos controlado, ya que se trata de un desove de todo el conjunto de los reproductores. El problema que puede presentar este tipo de inducción es la polispermia, si la cantidad de espermatozoides por ovocito es demasiado alta, los huevos pueden fecundarse por más de un espermatozoide y por consiguiente, las larvas pueden sufrir malformaciones. Una vez realizada la fecundación, el embrión se irá desarrollando y alimentando de las reservas almacenadas en el ovocito.

Aproximadamente dos días después, se forma la larva D comenzando entonces el cultivo larvario. Durante este tiempo se suceden diferentes estadios larvarios hasta la fijación y transformación en postlarva. La duración del cultivo larvario depende de la especie cultivada y de las condiciones generales de cultivo.

En esta fase, es preciso un especial control de parámetros como la temperatura, ya que cada especie tiene un rango específico en el cual se optimizan tanto el crecimiento como la supervivencia, también es de relevancia un control de la cantidad y calidad del fitoplancton (Doroudi & Southgate, 2000). Además debe controlarse la densidad de individuos en cada tanque de cultivo, el nivel de aireación y, es importante un control microbiológico, dado que los ejemplares utilizados en criadero como progenitores, tienen una carga bacteriana asociada (Jeffries, 1982) que puede ir aumentando a lo largo del cultivo.

La fijación o asentamiento de las larvas de bivalvos, ocurre cuando estas pasan de planctónicas a un tipo de vida sedentario o bentónico. Las larvas que están nadando en la columna de agua descienden al fondo a través de una secuencia de fases de natación y rastreo, que finalizan en un asentamiento en el fondo del mar una vez que eligen el sustrato adecuado.

Las larvas de bivalvos son capaces de diferenciar entre distintos sustratos y elegir el más adecuado. Pascual y Zampatti (1995) describen este comportamiento en la ostra *Ostrea puelchana* d'Orbigny, 1842. Bayne (1965) describe este mismo comportamiento en la especie *Mytilus edulis*. Otros autores, en el estudio de diversas especies de bivalvos, reportan que las larvas pediveliger son capaces de mantenerse en la parte inferior de la columna de agua y pasar por un período de natación y rastreo, durante el cual ponen a prueba el sustrato, hasta encontrar un sitio adecuado para la fijación (Isham y Tierney, 1953; Turner y George, 1955; Allen, 1961; Ansell, 1962; Sastry, 1965). Además, las larvas de muchos pelecípodos pueden retrasar su metamorfosis si las condiciones del medio no son favorables para la finalización de este importante proceso (Thorson, 1946; Wilson, 1960; Bayne, 1965).

En algunos casos la fijación al sustrato es permanente, como ocurre con la ostra mediante cementación de una de las valvas, pero en otros casos, puede ser de tipo semipermanente, mediante los filamentos que segrega la glándula del biso, fijándose solo el individuo durante un período determinado.

Las larvas de las almejas, se fijan con un biso en la superficie de la arena, en el fondo de los tanques de cultivo o en la superficie de contenedores, colocados en el interior de los tanques para tal fin, no necesitando ningún sustrato especial para su asentamiento (Gosling, 2003).

Durante el asentamiento de la larva a un sustrato o fijación, esta sufre la metamorfosis. Este proceso es relativamente corto y puede durar desde unas horas hasta unos pocos días, dependiendo de la especie y de las condiciones del medio. La metamorfosis, supone una serie de cambios en la forma y el comportamiento del organismo, incluyendo alteraciones en la locomoción, la dieta, la morfología y la secreción de la concha, ya que pasa a vivir el individuo en un nuevo ambiente. Quayle

(1952) señala que las modificaciones más evidentes en la almeja babosa son la pérdida del velo, el funcionamiento de la glándula del biso y la formación de la disoconcha o concha definitiva, que provee a la postlarva de una protección adicional. Al mismo tiempo que transcurren estos cambios, se forman los sifones, se desarrollan las branquias y los palpos labiales, además de producirse una reorganización de varios órganos, entre ellos la boca y el esófago. Con la pérdida del velo la alimentación pasa a ser asumida por las branquias. La actividad de la glándula del biso es común en los lamelibranquios, e incluso, en algunas especies, se puede mantener en la semilla y perderse en el adulto.

Una vez concluidos los cambios que engloba la metamorfosis, el individuo tiene el aspecto externo de un adulto y los órganos internos totalmente desarrollados. Comienza en este momento el cultivo postlarvario.

Diversos factores influyen en el cultivo de las postlarvas: densidad, flujo y calidad de agua, temperatura, alimentación y estructuras de cultivo. De todos estos factores y de un correcto manejo, dependerá el éxito en cuanto a crecimiento y supervivencia en esta fase del cultivo.

Alcanzada una cierta talla, las postlarvas se trasladan a los semilleros, o instalaciones dentro del criadero, con unas características específicas para esta fase del cultivo; el cultivo de semilla implica un mayor consumo de fitoplancton, por lo que se hace necesario un cambio en las estructuras y sistemas de cultivo.

En el caso de la coquina y de otras especies endobentónicas que viven enterradas en la arena, es de destacar el uso de sustrato en esta fase de su ciclo vital, la estrategia de incorporar arena en las estructuras de cultivo a partir del período postlarvario y de semilla, ya ha sido descrita para especies de solénidos (Darriba *et al.*, 2002; Martínez-Patiño y da Costa, 2008; da Costa, 2009).

El cultivo de semilla en criadero se mantiene hasta que esta alcanza una talla adecuada para su traslado al medio natural, comenzando aquí la etapa de preengorde. A medida que la semilla crece, la elevada demanda de alimento, el espacio y el manejo son, entre otros, factores que dificultan el mantenimiento de la misma en el criadero.

Con el objetivo de facilitar el cultivo y reducir los costes, se establece una etapa de preengorde en el medio natural previa a la siembra directa en los bancos naturales. En los diferentes sistemas empleados para esta fase del cultivo, es preciso hacer estudios comparativos para cada especie, ya que los comportamientos en cada caso son diferentes. Es necesario elegir un sistema que asegure la supervivencia, facilite el crecimiento de los individuos, las operaciones de limpieza, desdoble, clasificación y mantenimiento; además deben controlarse los parámetros ambientales pues, aspectos tales como la temperatura o la salinidad, especialmente en períodos de invierno, pueden ser limitantes a la hora de una correcta evolución en el medio externo.

El preengorde se puede hacer en instalaciones en tierra que, normalmente, son las propias instalaciones del criadero o anexadas al mismo. Se trata de grandes piscinas donde la semilla suele mantenerse en recipientes de diámetro variable, con mallas en consonancia con el tamaño de la semilla y alimentadas con fitoplancton, ya sea cultivado en sistemas a gran escala o bien con agua procedente de piscinas exteriores de gran capacidad, donde se producen “blooms” de fitoplancton. Otro tipo de sistemas en tierra son piscinas en las que se mantiene la semilla y se utiliza el agua procedente del efluente de una piscifactoría de rodaballo. La semilla se estabula en tambores de flujo por los que se hace pasar el agua canalizada desde la granja de rodaballo.

En las zonas de marismas, se aprovecha la producción natural de las mismas. En este tipo de semilleros se utilizan grandes superficies de estanques naturales, controlados mediante compuertas, de forma que se renueva parcial o totalmente el agua mediante el juego de mareas. En ellos se producen “blooms” naturales de fitoplancton que se suministra a la semilla.

Las zonas intermareales son las zonas del litoral situadas entre los niveles conocidos de las máximas y mínimas mareas, cubriéndose durante las mareas altas y quedando al descubierto durante las mareas bajas. Aquí se emplea generalmente una adaptación del sistema de bolsas utilizado para el cultivo de ostra. Estas bolsas ostrícolas se colocan sobre mesas de hierro en la zona intermareal de la playa. Pueden utilizarse también unos minisacos colocados sobre la misma estructura. Otro sistema es el de la siembra directa en el sustrato haciendo unos parques que, posteriormente, se recubrirán con una malla. También se puede utilizar cualquier tipo de jaula o caja

enterrada en el sustrato, fabricada para el fin que se pretenda, según la especie y la talla de la semilla.

En el cultivo en suspensión en el medio marino los sistemas de preengorde se encuentran totalmente sumergidos, por lo que las condiciones ambientales son más estables y la disponibilidad de fitoplancton es continua. Para colocar los diferentes artefactos de preengorde se pueden utilizar: bateas empleadas para el cultivo de mejillón, bateas especialmente diseñadas para este fin y sistemas de “long-line”.

El cultivo en suspensión se puede realizar con diferentes artefactos:

- Cestillos o cajas: la semilla se estabula en cuarterones plásticos colocados en cestos ostrícolas o cajas de plástico apiladas.
- Platillos y linternas: El sistema de platillos consiste en encajar entre sí varias unidades de bandejas plásticas circulares por medio de un eje tubular en su centro y se rodea todo el sistema con una malla plástica de diferentes luces, según el tamaño de la almeja estabulada. Las linternas presentan la misma estructura que el sistema de platillos, pero a diferencia de este, la linterna está totalmente compuesta por una malla plástica.
- Jaula con bolsas: el sistema de preengorde en bolsas utilizado en el intermareal, se adaptó para su ubicación en batea con una jaula que permite mantener estas bolsas en diferentes niveles.

Existen otros artefactos ideados inicialmente para la semilla de los solénidos como son los contenedores, realizados con tubos de PVC de 30 cm de diámetro, perforados y cubiertos de malla de 1 mm, donde se puede mantener la semilla con un sustrato de arena de distinto grosor.

Por último, cabe destacar, los cubos de polietileno con sistema de flujo forzado. Para este sistema se diseñó una batea específica, que consta de 2 partes diferenciadas: un generador de aire y unos contenedores para estabular la semilla, aunque también pueden colocarse las estructuras en una batea o un catamarán donde la energía necesaria

para el flujo en los contenedores puede venir de diferentes fuentes. Los contenedores de semilla en estas bateas suelen ser de tamaño más grande.

La semilla se preengorda durante unos meses y, posterior a esta fase, comienza la etapa de engorde o fase donde la semilla se adapta a las condiciones del medio y crece hasta la talla comercial.

Diferentes aspectos afectan al crecimiento y supervivencia en el medio natural, tales como: la talla inicial de siembra, las condiciones ambientales y la competencia con otras especies. La talla suele ser un factor limitante, ya que en general, cuanto menor es la talla de siembra, menor es la probabilidad de supervivencia y peor es la adaptación al medio. Las condiciones ambientales también ejercen una gran influencia ya que, no se obtienen los mismos resultados en los meses de primavera-verano, cuando la disponibilidad de alimento es mayor, las temperaturas son más suaves y la alteración de la salinidad es mínima, que en períodos de invierno cuando las condiciones del medio no favorecen el crecimiento y adecuado desarrollo de la semilla.

La coquina es una especie de molusco bivalvo muy dinámica de modo que, para seguir la evolución de la semilla sembrada en los bancos naturales, es necesario el empleo de algún tipo de estructura para poder asegurar su ubicación en el banco y poder hacer así su seguimiento.

El crecimiento de la semilla se puede cuantificar en términos de incremento de talla y peso. Existen modelos que relacionan estos parámetros ofreciendo patrones de crecimiento de la especie y que variarán en función del banco y condiciones a las que esté sometida. Estos modelos fueron descritos por Gaspar (1996) en coquinas de la costa portuguesa y por Martínez-Patiño (2002) en solénidos.

En este capítulo, se abordaron todas las fases de cultivo en criadero de la especie *D. trunculus*, desde la estabulación o acondicionamiento de los reproductores, la obtención de gametos de forma espontánea o después de la inducción a la puesta, la fecundación y el desarrollo embrionario, el cultivo larvario desde larva D hasta la metamorfosis, el cultivo postlarvario, cultivo de semilla hasta que sale al medio natural, cultivo de semilla o etapa de preengorde en el medio natural hasta su siembra y

finalmente, siembra en recintos controlados para seguir su comportamiento en cuanto a crecimiento y supervivencia en el banco natural de origen de los adultos. Se pretendieron optimizar todas las fases del cultivo de la especie para la obtención de semilla susceptible de ser utilizada con fines de repoblación en aquellos bancos en regresión.



5.2. MATERIAL Y MÉTODOS

5.2.1. Cultivo en criadero

5.2.1.1. Cultivo de fitoplancton

Se cultivaron las siguientes especies: *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, *I. aff. galbana* (T-iso), *Diacronema lutheri*, *Chaetoceros neogracile*, *C. muelleri* Lemmermann, 1898 y *Skeletonema costatum*.

Los cultivos fueron monoespecíficos, empleando agua de mar de salinidad comprendida entre 32-34‰, filtrada por filtros de arena y de cartucho de 5 µm. Los recipientes y el agua de cultivo para las primeras fases (cepas, matraces de 2 y 6 L) se esterilizaron en autoclave a una temperatura de 120°C durante 10 minutos aproximadamente.

Como nutrientes se emplearon ALGAL, SOLUCIÓN C y SOLUCIÓN SODIO SILICATO, esta última en el cultivo de diatomeas. Sus composiciones se especifican a continuación:

ALGAL

MACRONUTRIENTES

Nitrato potásico NO_3K	50 g/L
Fosfato monosódico NaH_2PO_4	3,4 g

MICRONUTRIENTES

Cloruro de manganeso MnCl_2	0,05 g/L
Citrato férrico $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$	0,65 g/L
Cloruro de zinc ZnCl_2	0,039 g/L
Cloruro de cobalto $\text{CoCl}_2+6\text{H}_2\text{O}$	0,006 g/L
Molibdato sódico $\text{Na}_2\text{MoO}_4+2\text{H}_2\text{O}$	0,072 g/L
Sulfato de cobre $\text{CuSO}_4+5\text{H}_2\text{O}$	0,009 g/L

QUELANTE

EDTA $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8+2\text{H}_2\text{O}$	1 g/L
(Ác. Etilendiaminotetraacético sal disódica 2-hidrato)	

5. Cultivo en criadero y en el medio natural

VITAMINAS

Tiamina	0,1 g/L
Cianocobalamina	0,12 g/L
Biotina	0,084 g/L

Posteriormente, se completa con 1L de agua destilada.

SOLUCIÓN C

MACRONUTRIENTES

Nitrato potásico NO_3K	80 g/L
Fosfato potásico bibásico $\text{K}_2\text{PO}_4\text{H}$	16 g/L

MICRONUTRIENTES

Sulfato de manganeso $\text{MnSO}_4+\text{H}_2\text{O}$	0,1 g/L
Sulfato de hierro $\text{Fe}_2\text{S}_3\text{O}_{12}$	1,2 g/L
Sulfato de zinc $\text{ZnSO}_4+\text{H}_2\text{O}$	0,018 g/L
Sulfato de cobalto $\text{CoSO}_4+\text{H}_2\text{O}$	0,002 g/L
Molibdato de sodio $\text{NaMoO}_4+2\text{H}_2\text{O}$	0,001 g/L
Sulfato de cobre $\text{CuSO}_4+5\text{H}_2\text{O}$	0,002 g/L

QUELANTE

EDTA $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8+2\text{H}_2\text{O}$	40 g/L
--	--------

(Ác. Etilendiaminotetraacético sal disódica 2-hidrato)

VITAMINAS

Tiamina	0,1 g/L
Cianocobalamina	0,005 g/L
Biotina	0,0013 g/L

También se completa con 1 L de agua destilada.

SOLUCIÓN SODIO SILICATO

40 mL Sodio Silicato Solución Neutra (Na_2SiO_3) + 960 mL H_2O

El cultivo inicial (Figura 5.1), donde se mantuvieron las cepas almacenadas para su empleo como inóculo de la siguiente fase del cultivo, se llevó a cabo en tubos de 20 mL. De ahí pasaron a matraces de 250 mL y se mantuvieron en cámara isoterma a una temperatura de $19\pm 1^\circ\text{C}$, con iluminación artificial continua. El siguiente cultivo se hizo en matraces de 2 litros de capacidad con los que se inocularon matraces de 6 litros. Estos se mantuvieron también en la cámara isoterma y con aireación constante enriquecida en CO_2 (al 1%). Como medio nutritivo, se empleó ALGAL en una concentración de 5 mL/L de cultivo.

La siguiente escala, consistió en un cultivo discontinuo en bolsas plásticas transparentes de entre 30 y 40 L de capacidad que se mantuvieron con iluminación

natural, temperatura ambiente (que osciló entre 17°C y 25°C en función de la época del año) y aireación constante. Como nutrientes se utilizó la SOLUCIÓN C en una concentración de 1 mL/L.

Para el cultivo en grandes volúmenes se utilizó el sistema de producción de microalgas en continuo. Los recipientes utilizados fueron bolsas plásticas transparentes de 400 L. El agua de entrada es esterilizada por un tratamiento de pasteurizado, elevando la temperatura a 75°C durante 30 min. Como nutrientes, se utiliza la SOLUCIÓN C en una proporción de 1 mL/L con dosificación automática por medio de una bomba peristáltica. El cultivo se realizó en un invernadero con luz natural regulando el fotoperíodo (18 horas de luz y 6 de oscuridad) por medio de un sistema de iluminación artificial mediante parrillas de 4 tubos fluorescentes de tipo luz-día.

Todas las microalgas empleadas para la alimentación, en cualquiera de las fases de cultivo, fueron cosechadas en su fase exponencial de crecimiento. Para el cálculo de la cantidad de fitoplancton a suministrar, se determinó la concentración de las microalgas con una cámara Bürker.

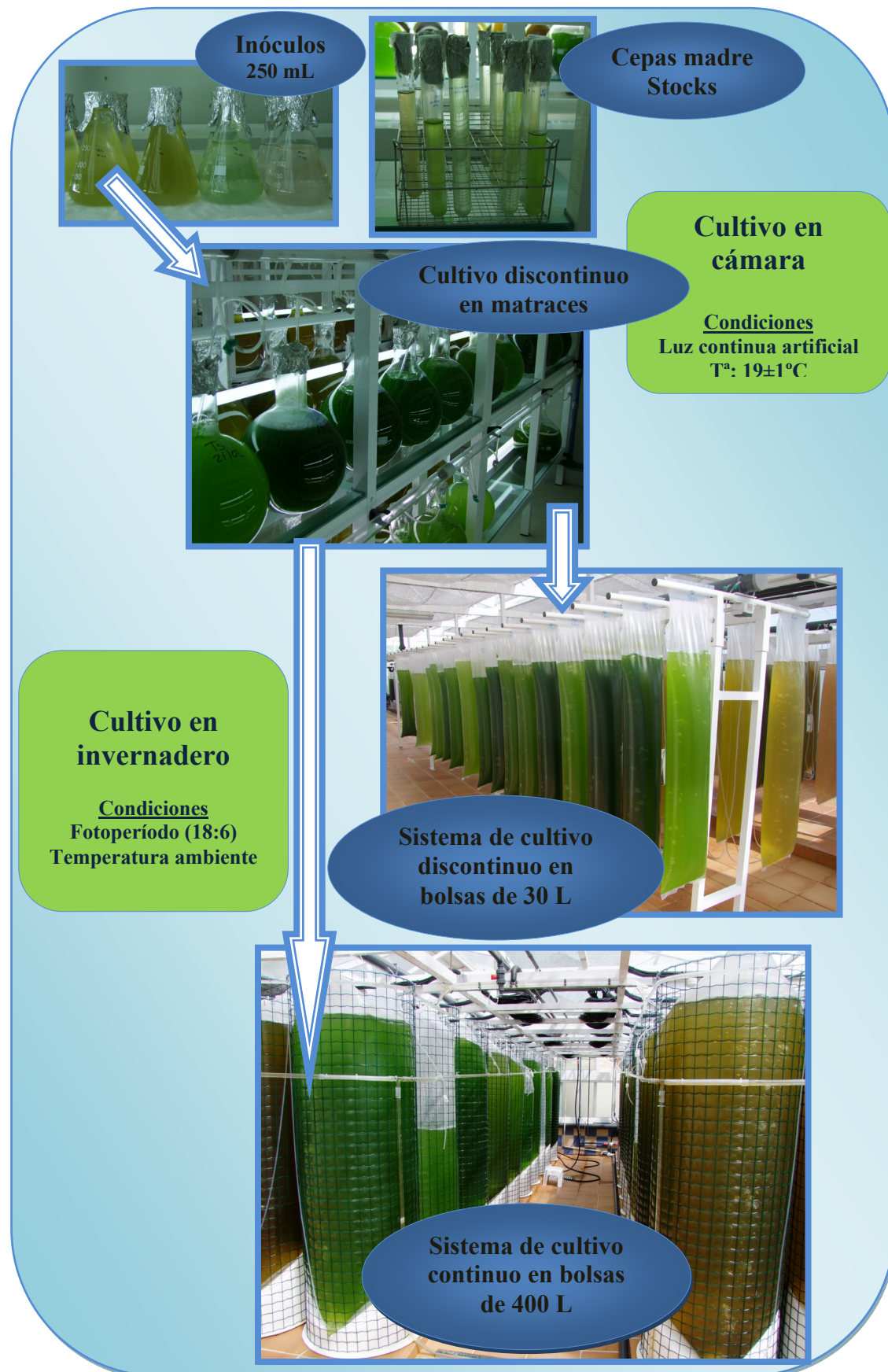


Figura 5.1. Esquema de los diferentes sistemas de cultivo de fitoplancton en la Planta de Cultivos Mariños de Ribadeo.

5.2.1.2. Recogida de los reproductores

La recogida de progenitores se realizó en los bancos de Vilarrube en Valdoviño y Abrela en O Vicedo, situados ambos en la zona norte de Galicia (Figura 5.2).

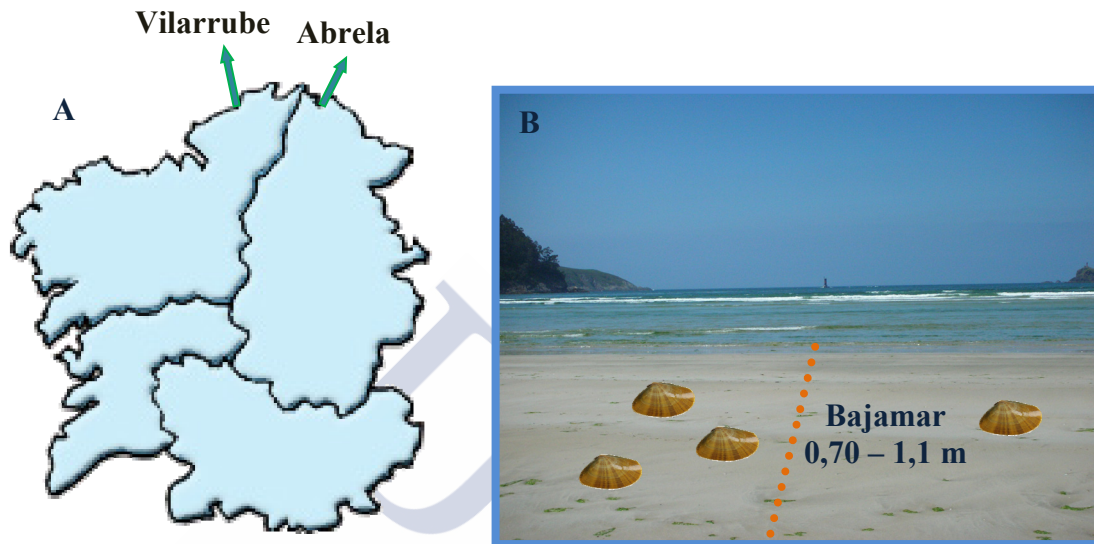


Figura 5.2. (A-B). A) Ubicación de los bancos de *D. trunculus* en el norte de Galicia. B) Rango de bajamar para el marisqueo de la especie.

La extracción de los individuos adultos se realiza mensualmente durante períodos de bajamar comprendidos entre los 0,70 m y 1,1 m de marea tal y como se observa en la figura 5.3.



Figura 5.3. Extracción de la coquina en los bancos de estudio.

Los lotes de progenitores procedentes del medio natural fueron trasladados al criadero en neveras portátiles donde se mantenían a una temperatura de 9°C durante 24 horas.

5.2.1.3. Estabulación de los progenitores

Los progenitores se colocaron en tanques con una capacidad de 200 litros, con entrada constante de agua de mar filtrada, mediante filtros de arena y con un flujo de renovación comprendido entre los 30 y los 40 L/h (Fig. 5.4). En cada tanque se colocaban inicialmente lotes de 3 kg que contenían en torno a los 500 ejemplares con talla comercial (35 mm).

La alimentación fue diaria y consistió en una dieta mixta compuesta por *Isochrysis galbana*, *Isochrysis aff. galbana* (T-iso), *Diacronema lutheri*, *Chaetoceros calcitrans*, *Chaetoceros neogracile*, *Skeletonema costatum*, *Phaeodactylum tricornutum* y *Tetraselmis suecica*. La ración de fitoplancton diaria administrada fue del 4% en peso seco de microalgas con respecto al peso seco de los reproductores. La temperatura del agua de los tanques se controló diariamente.

Bajo los canales de desagüe del tanque se colocan dos tamices: uno con malla de 45 micras para recogida de los posibles desoves en la parte inferior y otro de malla superior a 120 micras para recogida de desechos o residuos.



Figura 5.4. Tanque de estabulación de progenitores de coquina y tamices para la recogida de desoves.

Para facilitar las tareas de manejo, los progenitores se colocaron en bandejas con fondo de rejilla que permiten pasar heces y residuos.

Diariamente, se medía la temperatura del agua y se retiraban los ejemplares muertos.

5.2.1.4. Acondicionamiento de progenitores

Los ejemplares adultos de coquina fueron recolectados a principios del mes de febrero (2011) en el banco natural de Vilarrube, situado al NO de Galicia. La talla de los individuos fue superior a la comercial (35 mm). Los progenitores se trasladaron al Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo donde se estabularon en tanques de 200 L con circuito abierto de agua de mar filtrada, con una tasa de renovación de 6 L/h. La cantidad inicial fue de 150 coquinas por tanque, lo cual supone una densidad de 5 g/L.

5. Cultivo en criadero y en el medio natural

Las temperaturas seleccionadas para la experiencia de acondicionamiento en criadero fueron 3, en base a los siguientes criterios:

- T₁: 21°C - temperatura de cultivo larvario de la especie.
- T₂: 17°C - temperatura del medio en períodos próximos a la etapa de madurez.
- T₃: 13°C - temperatura del medio natural durante la recogida de los ejemplares.

La alimentación fue diaria y se utilizó una dieta mixta de fitoplancton cultivado en sistema continuo que consta de las siguientes especies: *Isochrysis galbana*, *Isochrysis aff. galbana* (T-iso), *Diacronema lutheri*, *Chaetoceros muelleri*, *Chaetoceros neogracile* y *Tetraselmis suecica*. La ración de alimento diario fue de un 3,5% de peso seco de las microalgas por peso seco de los reproductores.

Las experiencias se hicieron por duplicado y se mantuvieron hasta la obtención de puestas en las tres temperaturas. Para evaluar el estado de desarrollo gonadal, al llegar al criadero y después cada 2 semanas, se realizaron muestreos de las gónadas de los individuos para su estudio histológico. Se observó la gónada a nivel macroscópico y se procesaba siguiendo las técnicas histológicas y la escala del desarrollo gametogénico, descritas en el capítulo I. Se calculó también el siguiente índice de condición:

$$IC = (\text{Peso fresco carne} / \text{Peso fresco concha}) * 100$$

5.2.1.5. Inducción a la puesta

Los tratamientos utilizados para la obtención de puestas de la coquina en criadero, fueron los siguientes:

- Mantenimiento de los reproductores en seco en nevera (9°C) durante 24 horas y posterior inmersión en agua de mar a temperatura de 18°C.
- Mantenimiento de los reproductores en seco a temperatura ambiente (14-16°C) de 2 a 12 horas y posterior inmersión en agua de mar a temperatura de 18°C.
- Choques térmicos con subidas bruscas de la temperatura del agua hasta los 25°C durante 1 hora y bajadas hasta los 13°C durante 30 min, repitiéndolo varias veces

no más de 3 ó 4 ciclos. Generalmente se acompañó de la adición de alimento y de fragmentos de gónadas.

5.2.1.6. Recogida de desoves y fecundación

Los desoves se obtuvieron en masa o de un modo controlado. En el primer caso, se dejó desovar a todos los progenitores durante el tiempo necesario en el tanque sin hacer separación por sexos. En el desove controlado, los reproductores se separaron por sexos y se aislaron en recipientes de vidrio independientes. Esta separación permitió hacer una fecundación controlada y conocer el número de individuos que participan en cada uno de los desoves. En el caso de las hembras nos permitió obtener el número de óvulos por hembra en cada puesta. La fertilización se realiza con una mezcla de esperma de varios machos a razón de aproximadamente 30 espermatozoides por ovocito.

5.2.1.7. Cultivo larvario

Durante dos anualidades, se siguieron un total de 24 desoves obtenidos de manera espontánea o inducida indistintamente. Se tomaron datos de talla de ovocitos, talla de fijación y tiempo que se tardó en alcanzarla, supervivencia y tiempo de estabulación de progenitores en criadero.

En el caso de los desoves espontáneos, se recogían huevos ya transformados o larvas trocóforas, en función del tiempo transcurrido. En los desoves inducidos, los huevos recogidos y fecundados se trasladaban a los mismos tanques donde se realiza el cultivo larvario con una densidad inicial de 20 huevos/mL.

Los dos estadios, embrionario y larvario, se cultivaron en los mismos tanques de cultivo larvario (Figura 5.5); son tanques troncocónicos de fibra de vidrio, con una capacidad de 500 litros, empleando agua de mar filtrada y esterilizada por UV. La temperatura fue de $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ con ayuda de termostatos en invierno. Las larvas se mantuvieron con aireación constante por medio de una varilla de metacrilato en el centro de los tanques. La densidad inicial en el cultivo larvario fue de 10 larvas/mL dado que la transformación desde huevo a lava D solo es del 50% y esta densidad, fue

5. Cultivo en criadero y en el medio natural

disminuyendo a medida que avanzaba el desarrollo hasta una densidad media de 4 larvas/mL.

El cultivo larvario se realizó en circuito cerrado y la renovación total del agua de los tanques se hacía tres veces por semana. Para ello se situaban, debajo del desagüe, una serie de tamices de menor a mayor luz de malla, en base al tamaño de las larvas contenidas en el tanque y colocando al final una bandeja para impedir que las larvas se quedaran en seco (Figura 5.5A).

Una vez vaciado el tanque se lavaban las larvas retenidas en los distintos tamices, eliminando las más pequeñas y separándolas por tamaños (Figura 5.5B), se observaban al microscopio para ver su estado y se cogían muestras para hacer un conteo y una medición posterior de la longitud de la concha para estudiar su supervivencia y su crecimiento.



Figuras 5.5. (A-B). A) Vaciado de tanques de larvas. B) Manejo y lavado de larvas retenidas en los tamices.

La alimentación fue diaria a base de una dieta mixta de microalgas (*Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, *Isochrysis aff. galbana* (T-iso), *Diacronema lutheri*, *Chaetoceros neogracile* y *Chaetoceros muelleri*), cultivadas en sistema continuo. Comienza la alimentación, desde la larva D, con una ración de 20 células/ μ L, aumentándola según las necesidades del cultivo hasta 40 células/ μ L.



Figura 5.6. Tanque de cultivo larvario.

Con cada cambio total del tanque las larvas se pasaron por distintos tamices. Se aprovechó este momento para observar al microscopio, “in vivo”, el estado en el que se encontraban y también para eliminar las muertas y las que no crecían.

Para saber cuándo era necesario trasvasar los individuos a unos cilindros de malla de unos 150 μm de diámetro, inicialmente se realizaron observaciones al microscopio comprobando la presencia o no de pie de las larvas y determinando el porcentaje de larvas pediveliger. Observaciones preliminares permitieron determinar dos posibles porcentajes de pediveliger óptimos para maximizar la supervivencia en la fijación (50 y 70%). Se hicieron ensayos para determinar con cuál de estos dos porcentajes se obtenían mejores resultados.

5.2.1.8. Cultivo postlarvario y de semilla

Las larvas fijadas se mantuvieron en cilindros en circuito cerrado, en los mismos tanques de cultivo larvario, en cilindros con una malla de 150 μm , con una pequeña cantidad de arena de granulometría superior a 170 μm con flujo forzado descendente (Figura 5.7). La temperatura del agua fue ligeramente inferior a la del cultivo larvario ($18\pm 1^\circ\text{C}$). Los cilindros, se mantuvieron entre dos semanas y un mes dentro de los mismos tanques de cultivo larvario.



Figura 5.7. Cilindro de cultivo postlarvario.

El cambio de agua se realizó tres veces por semana. La alimentación diaria consistió en la misma dieta mixta utilizada en el cultivo larvario (*Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, *Isochrysis aff. galbana* (T-iso), *Diacronema lutheri*, *Chaetoceros neogracile* y *Chaetoceros muelleri*) cultivadas en sistema continuo. Se tamizaron cada 15 días y cuando las postlarvas quedaron retenidas en tamiz de malla superior a 400 μm , se trasladó la semilla a cilindros con luz de malla de 200 μm . Estos se colocaron en tanques de fibra de vidrio de 500 L de capacidad con circuito abierto (Figura 5.8). El sistema de cultivo postlarvario abierto, consta de una entrada y salida constantes de agua (con una tasa de renovación de 9 L/h) y fitoplancton cultivado en sistema continuo dosificado mediante bomba peristáltica. La ración de alimento diario fue de un 2% de peso seco de las microalgas por peso seco de los individuos.

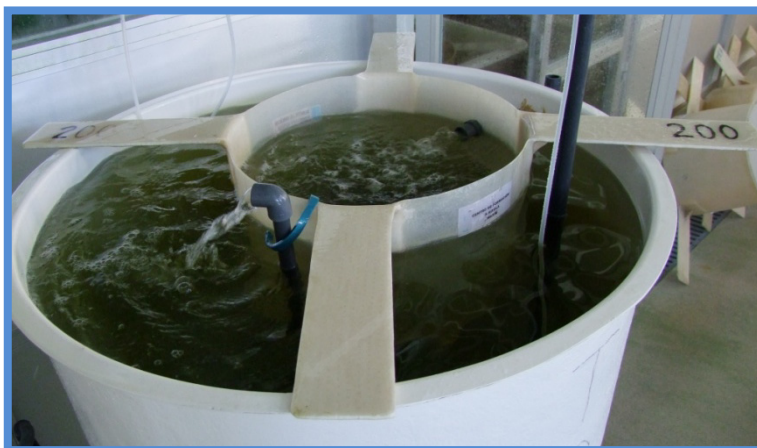


Figura 5.8. Sistema de cultivo postlarvario abierto.

5.2.2. Cultivo en el medio natural

5.2.2.1. Preengorde de semilla

La semilla se mantuvo en el criadero hasta el momento en que queda retenida en tamices de malla superior a 2.000 y 3.000 μm (T2 y T3). A partir de este tamaño, se trasladó al medio natural donde se ensayaron varias estructuras. Todas ellas se colocaron en un sistema en suspensión colgadas en un pantalán o en batea experimental y además se realizó una siembra directa en el sustrato.

En un pantalán localizado en la Ría de Ribadeo, se ubicaron los artefactos empleados durante el preengorde probando dos sistemas:

Cilindros de PVC con sustrato de 2 mm de arena de diámetro superior a 170 μm (Figura 5.9A). Se colocaron 4 cilindros superpuestos, cada uno de ellos tiene un diámetro de 20 cm y miden 22 cm de alto, además están rodeados por una malla de 1 mm que recubre 8 agujeros realizados para favorecer la circulación del agua. En el fondo estos cilindros llevan una malla de 150 μm para evitar la pérdida de arena.

Linternas (Figura 5.9B) compuestas de varios pisos separados por aros metálicos de 38 cm de diámetro envueltos por una malla plástica con luz de 1 mm.



Figura 5.9. (A-B). Estructuras para el preengorde de la coquina en el medio natural. A) Cilindros de PVC con sustrato de arena. B) Linternas.

Con el objetivo de estudiar la viabilidad y crecimiento de la semilla en las distintas estructuras, se hizo un estudio comparativo de una duración de cinco meses (de noviembre a marzo). Las diferentes cantidades experimentales en cada tipo de estructura, se indican en la figura 5.10.

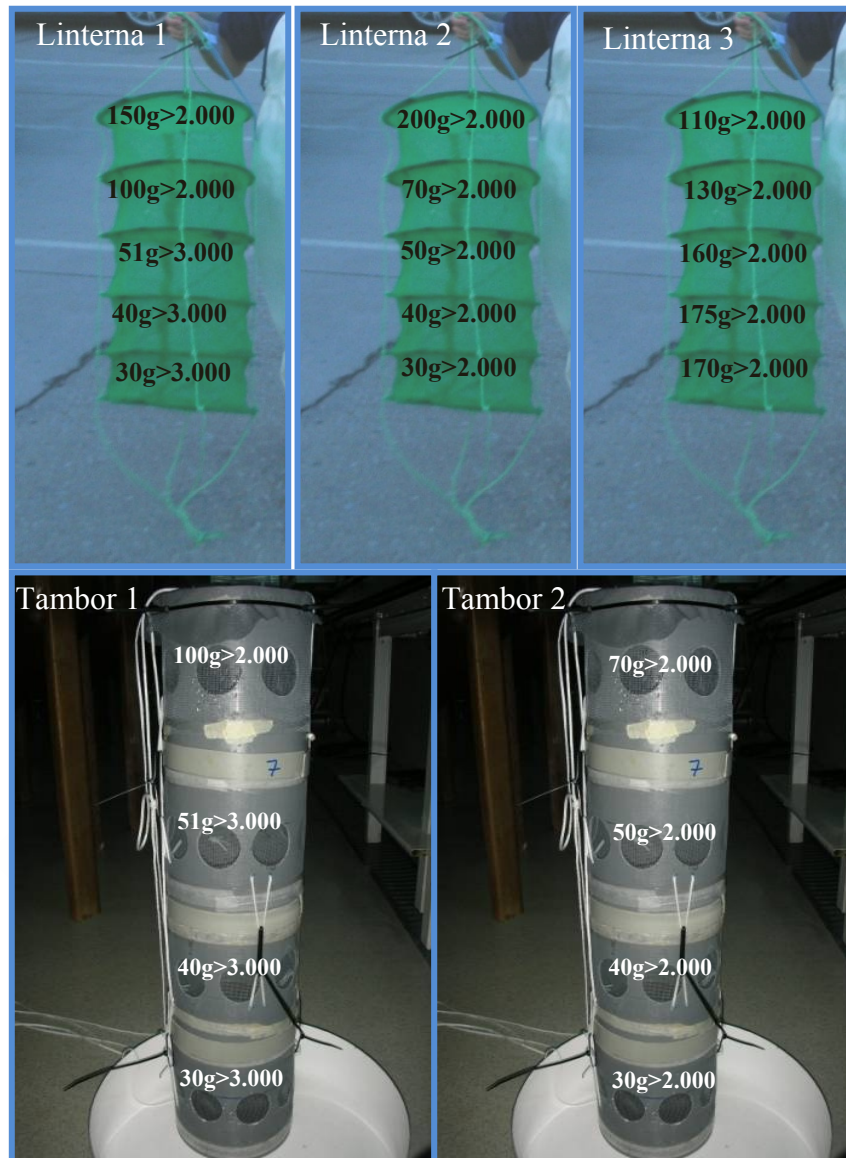


Figura 5.10. Esquema de los pesos en gramos y tallas en micras de la coquina en dos tipos de estructuras de cultivo durante el período de preengorde.

Además de realizar ensayos para definir la estructura de cultivo adecuada, se hicieron experimentos con tallas iniciales diferentes. En el mismo pantalán ubicado en la Ría de Ribadeo, se colocó una linterna durante siete meses (de agosto a marzo). En la figura 5.11 se especifican las cantidades y tallas utilizadas en esta experiencia de preengorde.

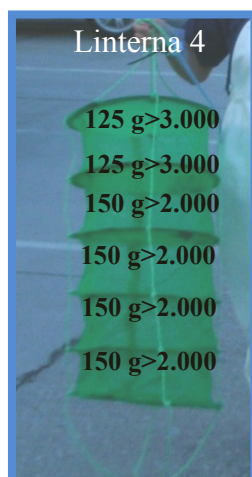
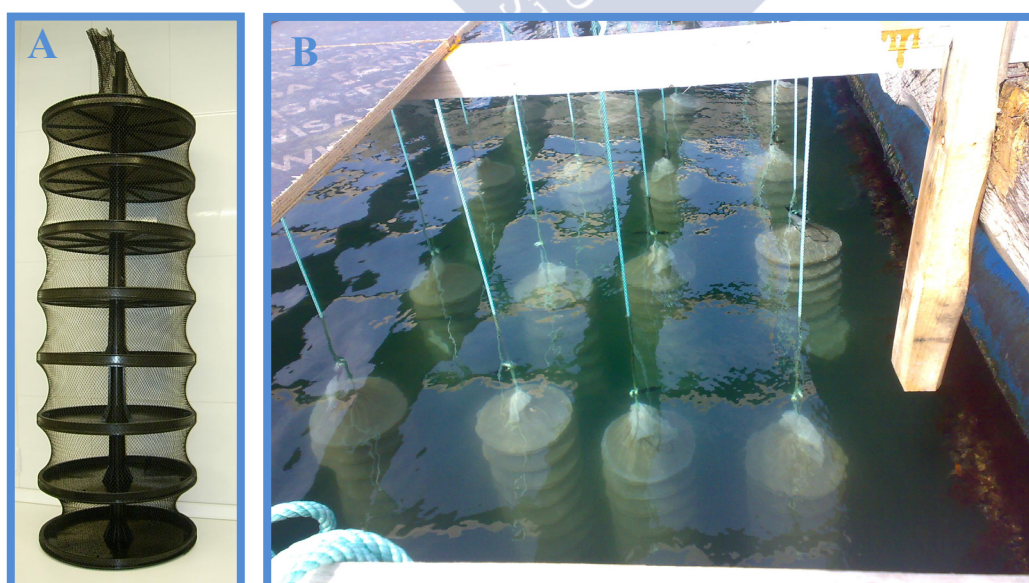


Figura 5.11. Distribución de las cantidades de coquina de diferentes tallas en una linterna utilizada como estructura de cultivo de semilla en el medio natural.

Otro de los sistemas empleados fue el de los platillos apilados de PVC recubiertos por una malla (Figura 5.12A). Consisten en unidades de bandejas plásticas circulares, con un eje tubular en su centro de forma que se encajan varias unidades entre sí, todo el sistema va rodeado de una malla plástica de luz superior a 1.500 μm . Estas estructuras se encuentran atravesadas por cuerdas mediante las cuales quedan suspendidas de una batea (Figura 5.12B) instalada en el polígono B de Vilagarcía en las cuadrículas número 255 y 256. En este modelo de platillos se hicieron dos tipos de experiencias de preengorde, con y sin sustrato de arena con una duración de seis meses (de abril a octubre). La experiencia se inició con semilla retenida en tamices de malla superior a 2.000 μm (T2); 2.500 μm (T2,5); 3.000 μm (T3) y 4.000 μm (T4).



Figuras 5.12. (A-B). A) Sistema de platillos de PVC envueltos por malla. B) Batea rectangular ubicada en el polígono B de Vilagarcía propiedad de la empresa Ameixa de Carril S.L.

El cuarto sistema utilizado (Figura 5.13) fue el de cubos de polietileno con sistema de flujo forzado. Los contenedores de estabulación de semilla tenían 50 litros de capacidad. El fondo está perforado con numerosos agujeros de 2 mm, superficie sobre la cual se puede instalar una malla con luz acorde al tamaño de la semilla introducida. El recipiente se cierra mediante una tapa en la que se coloca un tubo periscópico, constituido por una tubería de PVC. En su parte distal va adosada una pieza, con forma de “T” del mismo material y diámetro, bajo la cual se inserta un flotador para dotar de estabilidad a la estructura. Con la inyección de aire se fuerza la entrada del agua a través del fondo del contenedor, para salir en la parte superior, a través de los dos ramales de la estructura con forma de “T”.



Figura 5.13. (A-D). A) Cubo de polietileno para preengorde de semilla. B) Instalación de contenedores de preengorde. C) Ramales superiores de salida de agua. D) Estructuras de preengorde instaladas en el pantalán del puerto de O Vicedo.

Esta estructura de preengorde fue instalada en un pantalán ubicado en el puerto de O Vicedo en el mes de julio. Las tallas iniciales estuvieron comprendidas entre 1.500

μm (T1,5) y $4.000 \mu\text{m}$ (T4), la experiencia duró hasta septiembre (tres meses de preengorde).

Esta misma estructura de cultivo (cubos de polietileno con sistema de flujo forzado) se empleó en otra área geográfica para otra partida de semilla de diferentes rangos de talla. En este caso se ensayó el preengorde de la coquina en una batea experimental ubicada en Camariñas (Figura 5.14) donde, en meses de primavera – verano (de abril a julio), comenzó esta fase de cultivo con semilla retenida en tamices de malla de $2.000 \mu\text{m}$ (T2); $2.500 \mu\text{m}$ (T2,5); $3.000 \mu\text{m}$ (T3) y $4.000 \mu\text{m}$ (T4).



Figura 5.14. Preengorde de semilla de coquina en cubos de polietileno con flujo forzado en batea experimental ubicada en el puerto deportivo de Camariñas.

La última experiencia de preengorde ensayada fue la siembra directa de semilla en el sustrato, se emplearon unas estructuras para poder hacer un seguimiento de la misma.

La semilla de coquina con una talla media de $7,5 \text{ mm}$, cultivada en criadero y con 11 meses de vida desde la obtención de las puestas (Figura 5.16), se trasladó a un banco natural, en vías de recuperación, denominado “O Lombo das Navallas”, localizado en la Ría de O Barqueiro (Figura 5.18).

Los individuos se colocaron en cuatro jaulas (Figura 5.15), con armazón de acero inoxidable, con un área de $50 \times 50 \text{ cm}$ y 50 cm de altura, recubiertas con malla

rígida de 2 mm de luz. Las jaulas se enterraron a 30 cm de profundidad dejando 20 cm al descubierto.

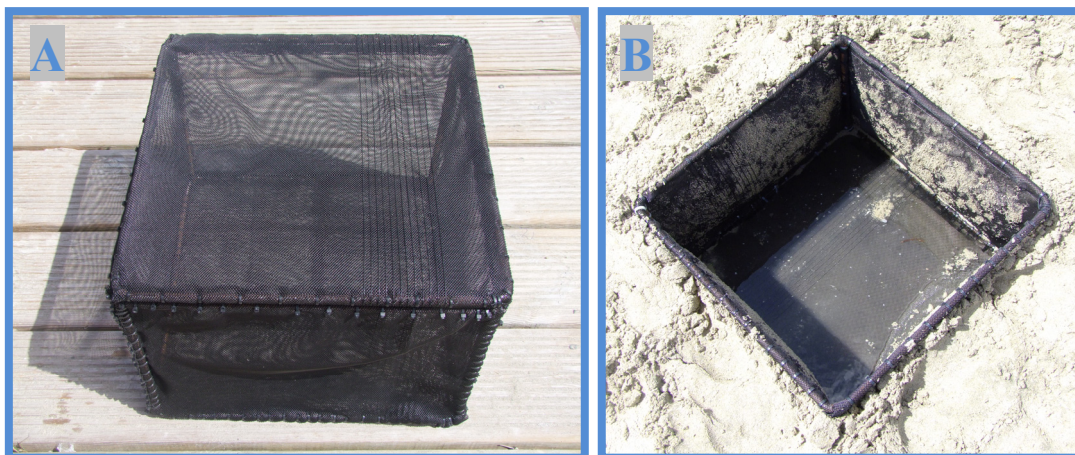


Figura 5.15. (A-B). Jaulas para engorde.

Se aprovecharon períodos de bajamar para la siembra de semilla en las estructuras de cultivo (Figuras 5.17A y B). La cantidad inicial de juveniles de coquina para preengorde fue de 1.500 individuos por jaula. Estos se depositaron cuidadosamente en las jaulas añadiendo agua de mar para facilitar su enterramiento en el sustrato (Figuras 5.17C y D).



Figura 5.16. Semilla de *D. trunculus* de 7,5 mm para preengorde directo en el sustrato.

5. Cultivo en criadero y en el medio natural

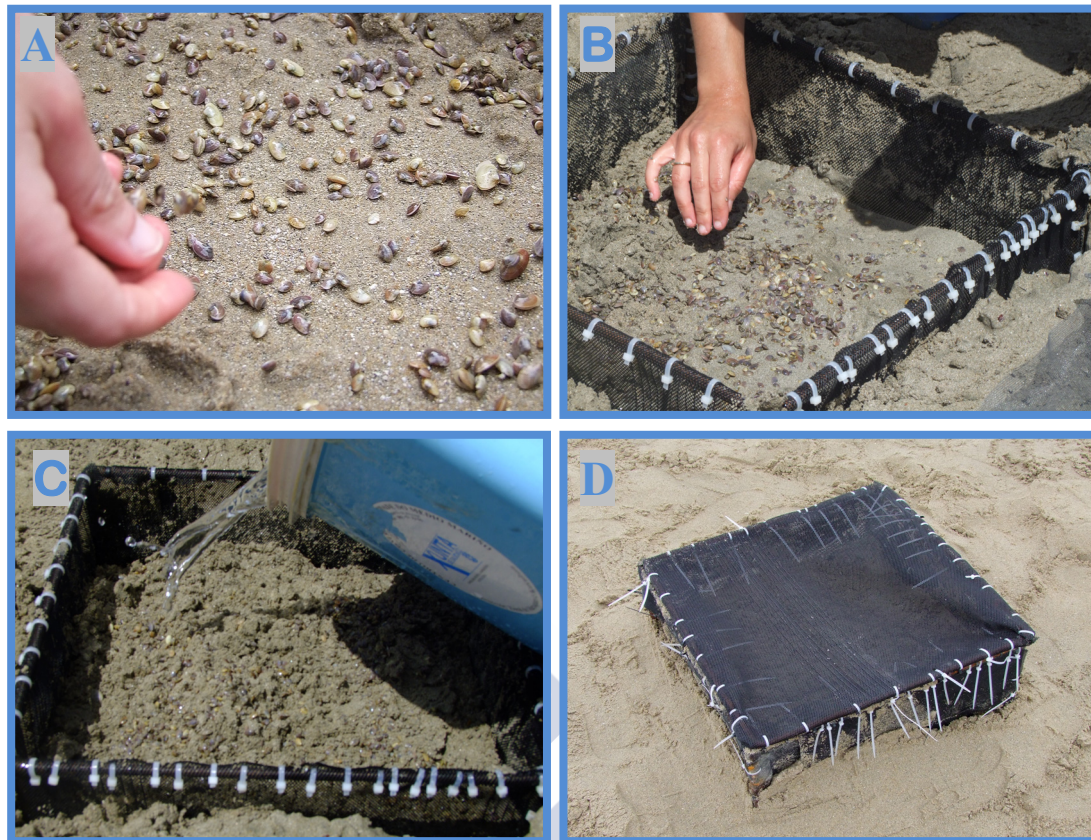


Figura 5.17. (A-D). Siembra de *D. trunculus* en las estructuras de preengorde.



Figura 5.18. Ubicación de las estructuras de preengorde de *D. trunculus* en el banco de O Lombo das Navallas en la Ría de O Barqueiro. Ortofoto en SIGPAC realizada por Aitor Freire, asistencia técnica de la cofradía de O Vicedo durante la experiencia.

5.2.3. Toma de medidas y tratamiento de datos

5.2.3.1. Recogida de desoves. Número de ovocitos por hembra

Cuando los reproductores comenzaron a desovar en el tanque, estos se separaron por sexos y se aislaron en recipientes de vidrio independientes. En el momento en que dejaron de emitir gametos al exterior, se trasladó el contenido de cada frasco a un vaso de precipitados, se homogeneizó la muestra y se recogieron con pipeta automática 5 alícuotas que se depositaron en portaobjetos excavados. Se calculó el número de individuos existente en cada submuestra y se hizo una media para calcular el número total de ovocitos emitidos por hembra.

De cada desove se tomó una muestra de 100 individuos para obtener las medidas de longitud (OL) y ancho (OB). Para ello, se utilizó un Analizador de Imagen (PC Image) sobre fotografías realizadas con una cámara adaptada a un microscopio óptico Nikon Labophot-2 (Figura 5.19).

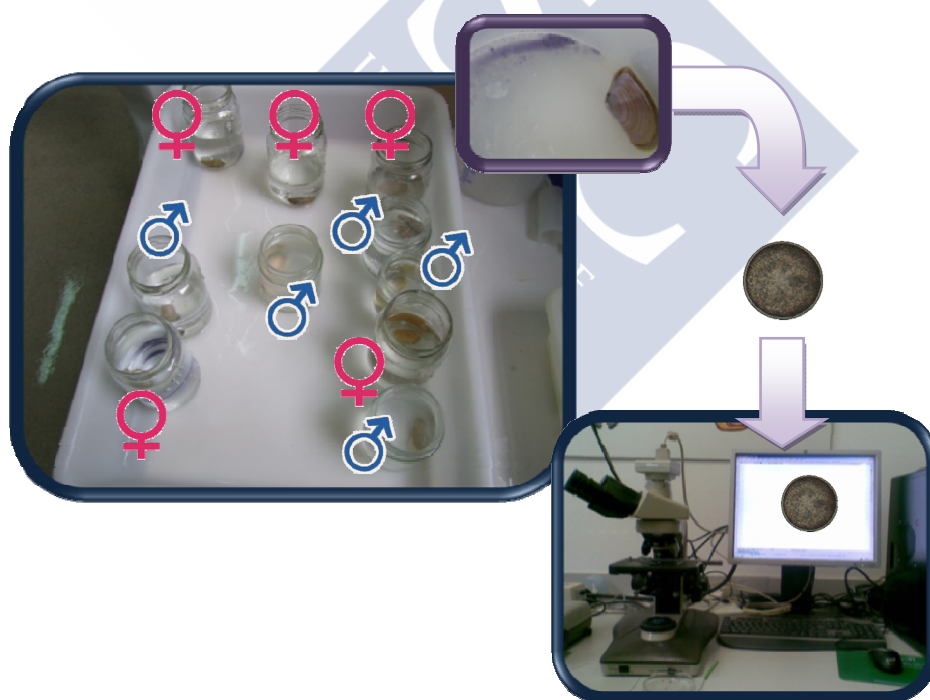


Figura 5.19. Separación de puestas de coquina por sexos. Observación y toma de medidas de los huevos en analizador de imagen.

5. Cultivo en criadero y en el medio natural

5.2.3.2. Cultivo larvario. Crecimiento y supervivencia

En el cultivo larvario, dos veces por semana, se tomaron muestras para obtener datos de longitud y anchura de un total de 100 larvas por muestra, medidas con el Analizador de Imagen (PC-Image).

Para el cálculo de supervivencia, una vez por semana, se realizaron conteos de las larvas siguiendo el método descrito en el apartado 2.3.1. La supervivencia durante esta fase de cultivo, se calculó a partir del número inicial de huevos o larvas D y se contabilizó hasta el momento de la fijación.

5.2.3.3. Cultivo postlarvario y de semilla. Crecimiento y supervivencia

Para la obtención de datos de crecimiento y supervivencia durante el cultivo postlarvario y de semilla, se toman las muestras cada 15 días y se calcula el número de individuos a partir del peso total de la muestra. Para ello se pesaron 5 submuestras en una balanza de precisión Gram Precision (0,01 g de precisión), se contó el número de individuos en cada sublote y se hizo una media (número de individuo-gramos) que, por extrapolación, permite conocer el número total de individuos de la muestra (Figura 5.20).

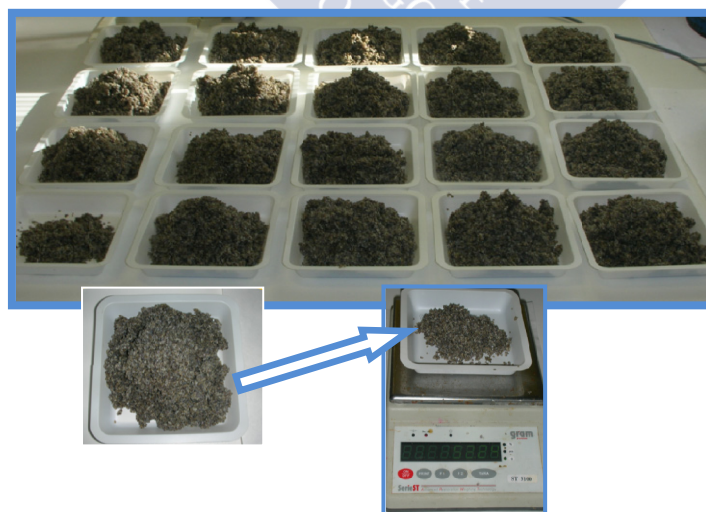


Figura 5.20. Cálculo del número de semilla existente por extrapolación de sublotes.

Después de la realización del conteo, en función de su tamaño, los individuos se midieron, bien en analizador de imagen (PC Image) o con calibre digital Mitutoyo (0,01

mm de precisión) para ejemplares de mayor tamaño. El número de individuos medidos por muestra fue de 100.

5.2.3.4. Cultivo en el medio natural. Crecimiento y supervivencia

5.2.3.4.1. Preengorde de semilla

El procedimiento para la obtención de datos de crecimiento y supervivencia de la semilla durante el preengorde fue el mismo que se describió en el apartado 2.3.3. Los muestreos se realizaron mensualmente.

5.2.3.4.2. Siembra directa de semilla en el sustrato

Cada mes, y en períodos de bajamar comprendidos entre los 0,43 y 0,46 m de marea en la zona donde estaban ubicadas las jaulas, se hizo un muestreo de la población para el estudio de biometrías: longitud (mm), peso (g) y un conteo para el control de la supervivencia (Figura 5.21).



Figura 5.21. Muestreo de estructuras de preengorde para la obtención de biometrías y datos de supervivencia.

Para la obtención de datos de longitud y peso se utilizó un calibre digital Mitutoyo (precisión 0,01mm) (Figura 5.22A) y una balanza de precisión Scaltec (precisión 0,1 g), respectivamente (Figura 5.22B).



Figura 5.22. (A-B). A) Medición de longitud de la semilla con calibre digital. B) Control de peso con balanza de precisión.

Las condiciones ambientales y datos de temperatura ($^{\circ}\text{C}$), pH, salinidad (‰) y oxígeno disuelto (ppm), se midieron semanalmente en este punto con una sonda HI 9828 cedida por el INTECMAR, los datos fueron recogidos y cedidos por la asistencia técnica de la cofradía de O Barqueiro.



5.3. RESULTADOS

5.3.1. Cultivo en criadero

5.3.1.1. Acondicionamiento de progenitores

Como se observa en la figura 5.23 en el muestreo inicial, el 80% de los individuos se encontraban en estadio E1 de inicio del desarrollo gametogénico. A nivel macroscópico, no se observaron diferencias en la coloración de las gónadas de machos y hembras. Sin embargo, se observaron diferencias a nivel microscópico en un 53% de los ejemplares (7% machos y 46% hembras). El resto de la población en este muestreo inicial (un 20%), se encontraba en estadio E2 de gametogénesis avanzada, de ellos, un 13% de los individuos muestreados fueron hembras y un 7% machos. En el segundo muestreo, que tuvo lugar aproximadamente 2 semanas después, solo quedaban individuos en estadio E1 en los tanques tratados a temperatura más baja (13°C). Los tanques a 17°C estaban en gametogénesis avanzada E2 y en los acondicionados a 21°C, ya había un 34% de progenitores en estadio E3 de madurez. A medida que avanzó el acondicionamiento, se produjo una evolución en el desarrollo gonadal siendo más acusado en los individuos tratados con temperatura más elevada, con un 83% de los ejemplares maduros. Le siguieron los individuos acondicionados a 17°C, con una proporción del 50% en estadio E3, y por último, en los tanques con menor temperatura (13°C) solo el 33% de individuos se encontraban en estadio E3 o de madurez. En el 2º y 3º muestreo, ya se diferenciaba el sexo a nivel macroscópico en las tres temperaturas, se ven las gónadas femeninas de color violáceo y de color blanco en los machos.

5. Cultivo en criadero y en el medio natural

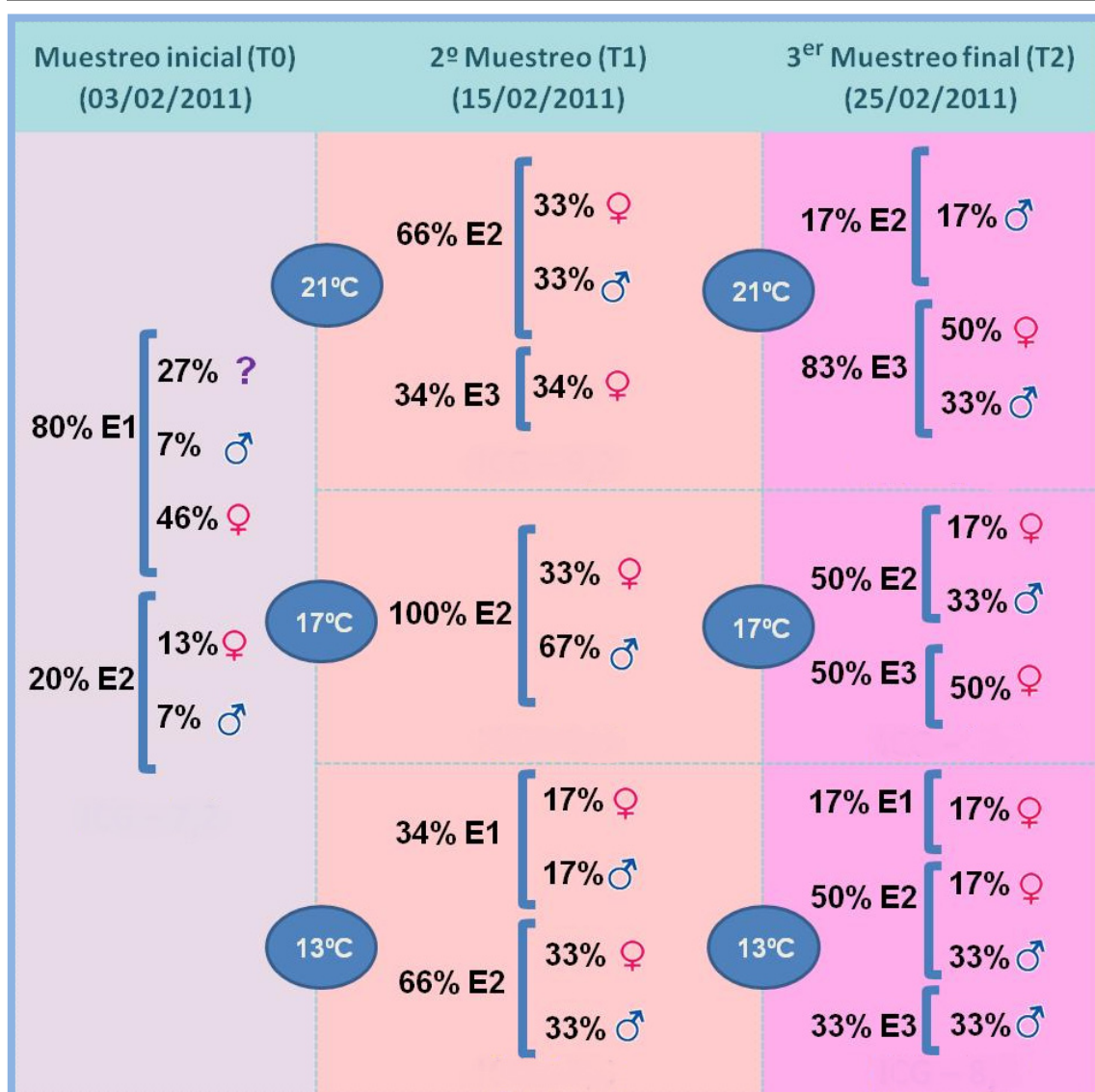


Figura 5.23. Proporción de individuos en cada estadio de maduración gonadal.

A los 14 días del acondicionamiento, tuvo lugar el primer desove de los reproductores mantenidos a la temperatura más elevada. Las puestas obtenidas para cada una de las temperaturas empleadas, se especifican en la tabla V.1.

Tabla V.1. Puestas de los reproductores de coquina acondicionados a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Días acondicionamiento	Puesta	Número de huevos
21°C	14	CQ1	6.000.000
17°C	22	CQ2	6.000.000
21°C	25	CQ3	20.000.000
17°C	25	CQ4	14.000.000
13°C	25	CQ5	12.000.000

La maduración gonadal en las coquinas acondicionadas a 21°C fue más rápida y la cantidad de huevos obtenidos a esta temperatura fue mayor, sin embargo, el porcentaje de supervivencia de los reproductores fue menor, solo un 28%. Los progenitores acondicionados a 17°C presentaron un 44% de supervivencia y los que permanecieron a temperatura de 13°C un 76%.

5.3.1.2. Inducción a la puesta y recogida de desoves

Cuando los progenitores de la coquina están en período de madurez en el medio natural, se obtienen las puestas sencillamente manteniéndolos en la nevera las 24 horas de su traslado al criadero e introduciéndolos en los tanques de estabulación a una temperatura de 16°C.

En caso de no obtener desoves espontáneos, se pueden realizar inducciones además del choque térmico, uno de los métodos que resultó de mayor eficacia en *D. trunculus*, fue el mantenimiento de reproductores en seco a temperatura ambiente (14°-16°C) durante aproximadamente 10 horas para su posterior introducción en agua de mar a una temperatura en torno a los 18°C.

Los machos fueron los primeros en desovar y emitieron un chorro continuo de esperma de color blanquecino (Figura 5.24A). Al cabo de aproximadamente media hora, fueron las hembras las que comenzaron a emitir huevos, este desove se caracteriza por ser de color violáceo y de aspecto granular (Figura 5.24B).



Figuras 5.24. (A-D). A) Macho de coquina desovando. B) Hembra de coquina emitiendo gametos. C-D) Puesta de *D. trunculus* de color violáceo.

Con siete desoves controlados se pudo conocer el número de ovocitos emitido por cada hembra y este osciló entre 598.800 y 986.400, con una media de 793.200 ± 151.677 ovocitos (Tabla V.2).

Tabla V.2. Número de huevos emitidos por hembra y número de hembras implicadas en cada puesta.

Inducción	Fecha	Nº huevos/puesta	Nº hembras	Nº huevos/hembra
1	2009	20.472.000	24	849.600
2	2009	15.460.000	15	986.400
3	2010	3.219.000	5	655.200
4	2010	12.720.000	17	727.200
5	2011	22.371.000	23	980.000
6	2011	4.060.000	5	755.200
7	2011	2.920.000	5	598.800
Nº medio de huevos/hembra				793.200 ± 151.677

5.3.1.3. Cultivo larvario

El tamaño medio de los huevos osciló entre 75 y 85 μm en los 24 desoves estudiados. A las 40 horas post-fertilización, se transformaron en larva D veliger con una talla de 105-110 μm . El porcentaje medio de transformación de huevo a larva D fue de un 57%, con un mínimo en uno de los desoves del 29% y un máximo en otro desove diferente del 88%.

Al cabo de aproximadamente 8 días de cultivo, la larva comenzó a umbonarse, en este momento la talla se mantuvo en torno a las 170 μm .

Alrededor de los 20-25 días desde el inicio del cultivo, se empezó a observar las primeras larvas pediveliger dotadas de pie y velo. Estas larvas medían aproximadamente 200 μm y quedaban retenidas en el tamiz de 170 μm . A partir de ahí, se podía ver cómo las larvas tendían a fijarse en las paredes y fondo del tanque, por lo que era necesario chorrearlo cuidadosamente para despegarlas cada vez que este se vaciaba. Siguiendo el criterio obtenido después de los ensayos realizados para determinar en qué momento se ponían a fijar las larvas, cuando el 50% de la población presentaban pie, los individuos se ponían a fijar empleando para ello tamices de malla de 150 μm , con una fina capa de arena de grano de 170 μm .

En torno a los 30 días, tras la fecundación, las larvas quedan retenidas en el tamiz de 200 μm y ya han finalizado la metamorfosis.

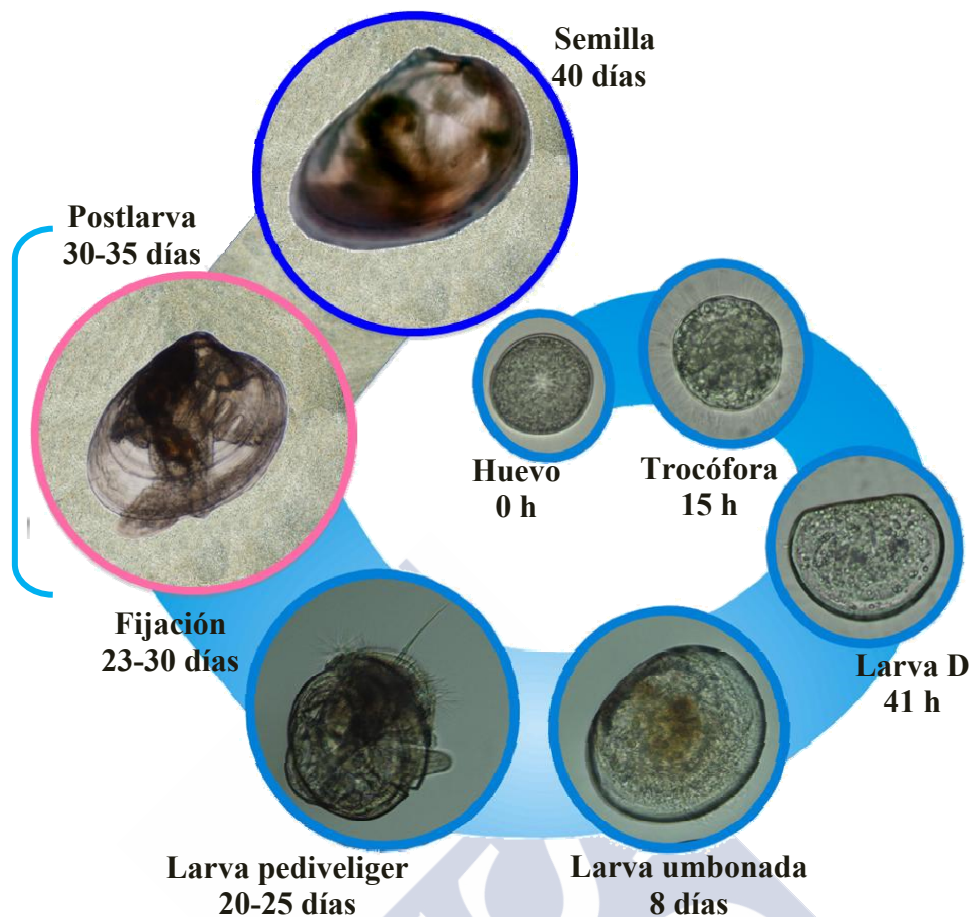


Figura 5.25. Estadios de desarrollo de *D. trunculus* en criadero.

Durante el cultivo larvario el crecimiento de la coquina, *D. trunculus*, corresponde a un modelo de crecimiento lineal con un ajuste $R^2 = 0,74$ con un crecimiento diario de $5,49 \mu\text{m}/\text{día}$ (Figura 5.26).

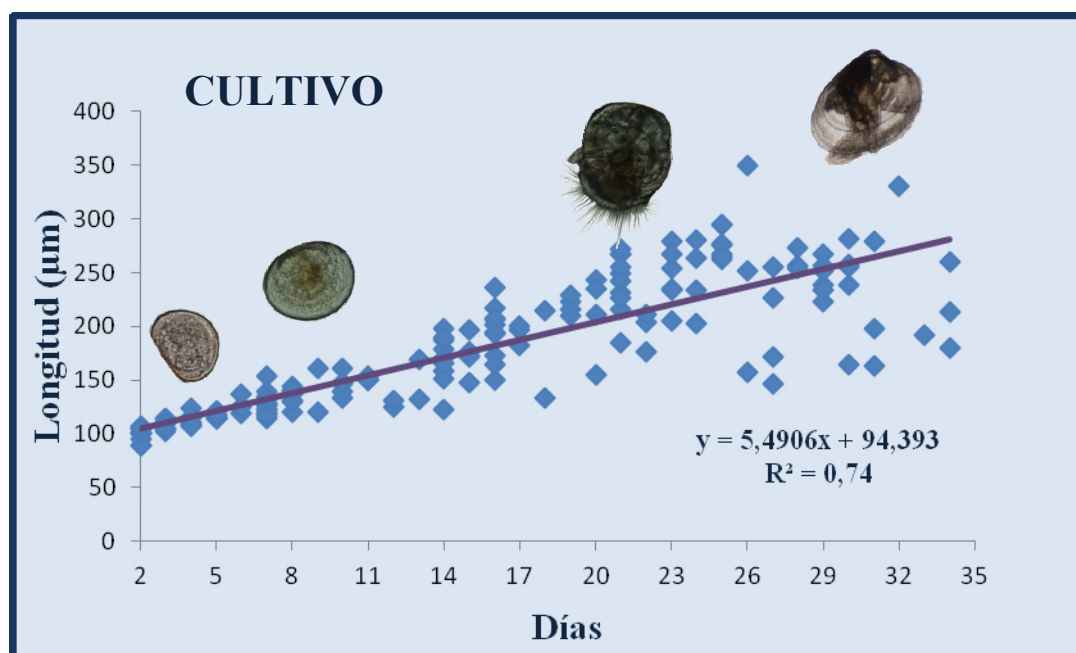


Figura 5.26. Crecimiento en longitud de *D. trunculus* durante el período larvario.

De todos los desoves obtenidos de los reproductores estabulados en criadero a lo largo de dos años de estudio, se detallan en las siguientes tablas (V.3 y V.4) las tallas de ovocito y fijación, tiempo de estabulación de los progenitores en criadero, tiempo transcurrido hasta la fijación y porcentajes de supervivencia desde el estadio de larva D hasta la fijación.

Tabla V.3. Tiempos de estabulación de progenitores en criadero, talla, tiempo y supervivencia desde larva D hasta fijación durante el primer año de estudio.

Lotes de reproductores	Desoves	Talla de ovocitos	Tiempo de estabulación en criadero	Talla de fijación (µm)	Tiempo hasta la fijación	Supervivencia desde larva D hasta fijación
1 (12/02)	1A (17/03)	78 µm	5 días	299 µm	25 días	14%
	1B (08/05)	78 µm	85 días	253 µm	23 días	15%
2 (24/03)	2A (30/03)	79 µm	6 días	-	-	-
	2B (08/05)	80 µm	45 días	275 µm	25 días	20%
	2C (19/05)	82 µm	56 días	238 µm	30 días	31%
	2D (21/05)	85 µm	58 días	280 µm	30 días	31%
3 (22/04)	3A (08/05)	72 µm	16 días	-	-	-
	3B (21/05)	75 µm	29 días	330 µm	32 días	34%
	4A (29/04)	77 µm	2 días	273 µm	34 días	21%
4 (27/04)	4B (21/05)	77 µm	24 días	-	-	-
	4C (26/05)	85 µm	29 días	256 µm	30 días	22%
	4D (28/05)	82 µm	31 días	260 µm	35 días	46%
5 (28/05)	5A (29/05)	80 µm	1 día	350 µm	26 días	54%
	5B (03/06)	73 µm	6 días	267 µm	29 días	54%

5. Cultivo en criadero y en el medio natural

Tabla V.4. Tiempos de estabulación de progenitores en criadero, talla, tiempo y supervivencia desde larva D hasta fijación durante el segundo año de estudio.

Lotes de reproductores	Desoves	Talla de ovocitos	Tiempo de estabulación en criadero	Talla de fijación (μm)	Tiempo hasta la fijación	Supervivencia desde larva D hasta fijación
1 (28/03)	1A (25/04)	81 μm	27 días	256 μm	30 días	29%
2 (25/04)	2A (26/04)	80 μm	1 día	273 μm	26 días	22%
	2B (25/05)	77 μm	30 días	279 μm	31 días	12%
3 (07/06)	3A (11/06)	79 μm	4 días	279 μm	25 días	18%
	3B (12/06)	82 μm	5 días	279 μm	25 días	25%
	3C (14/06)	80 μm	7 días	227 μm	27 días	28%
	3D (15/06)	80 μm	8 días	280 μm	24 días	41%
	3E (26/06)	85 μm	19 días	253 μm	35 días	6%
	3F (27/06)	83 μm	20 días	238 μm	35 días	25%
	3G (28/06)	82 μm	21 días	-	-	-

Los progenitores maduros de coquina desovaron varias veces a lo largo de su permanencia en el criadero. De cada uno de los ocho lotes de reproductores estabulados, se obtuvieron puestas que oscilaron entre un mínimo de una y un máximo de siete por lote. Cada uno de estos lotes, se mantuvo entre uno y tres meses aproximadamente en el criadero.

El tamaño medio de los ovocitos fue de $79,7 \pm 3,4$ μm oscilando entre un mínimo de 72 μm y un máximo de 85 μm. Al cabo de un mes de cultivo aproximadamente, la coquina alcanzó la fijación con una talla media de $272,3 \pm 29,2$ μm.

En la primera anualidad, las puestas 2A, 3A y 4B, murieron antes de fijar. El resto de los desoves alcanzaron la fijación con porcentajes de supervivencia, desde la etapa de larva D, comprendidos entre el 14% y el 54%.

Los mayores porcentajes de supervivencia larvaria fueron de 31% en desoves procedentes de progenitores que habían permanecido en torno a dos meses en criadero, de 46% en aquellos que habían permanecido durante un mes y de 54% en puestas cuyos reproductores apenas pasaron una semana en el criadero.

En el segundo año de estudio todos los desoves llegaron a fijación, a excepción de la última puesta obtenida del último lote de progenitores llegado al criadero. Los porcentajes de supervivencia, desde la etapa de larva D hasta la fijación, oscilaron entre un mínimo de 6% y un máximo de 41%. Al igual que en la anualidad anterior, no se

observó relación entre los porcentajes de supervivencia de las puestas y el tiempo de permanencia de sus progenitores en el criadero.

5.3.1.4. Cultivo postlarvario y de semilla

En la etapa de postlarva, durante el primer mes, los individuos tienen un aspecto translúcido, en ellos se aprecian estructuras tales como los filamentos branquiales, aparato digestivo y el pie (Figura 5.27A). A medida que se van desarrollando, la concha se endurece apareciendo más opaca y tomando coloraciones propias de los individuos adultos (Figura 5.27B).



Figura 5.27. (A-B). A) Postlarva de coquina. Se observan: pie, aparato digestivo y tejido branquial. B) Semilla de *D. trunculus*.

El cultivo postlarvario y de semilla en la coquina duró aproximadamente 3 meses. Durante esta etapa, el crecimiento en longitud de la especie se ajustó a un modelo lineal con un ajuste de $R^2=0,98$ y con un crecimiento diario de 0,04 mm/día (Figura 5.28).



Figura 5.28. Crecimiento en longitud de *D. trunculus* durante el período postlarvario.

Una vez superada la etapa larvaria, el porcentaje medio de supervivencia de postlarvas y semilla hasta la etapa de preengorde fue de un 35%, oscilando entre un valor mínimo del 13% y una supervivencia máxima de un 55%.

5.3.2. Cultivo en el medio natural

5.3.2.1. Preengorde de semilla

5.3.2.1.1. Experiencia 1

La semilla se mantuvo en criadero hasta que quedó retenida en tamices de malla comprendida entre 2.000 y 3.000 μm . En este momento, la semilla tenía 4 meses de permanencia en criadero y provenía de puestas obtenidas a finales del mes de junio. Esta semilla se utilizó para realizar una primera experiencia en la que se ensayaron dos tipos de estructuras para el preengorde de semilla en el medio natural: las linternas de 0,99 mm de malla, sin sustrato y los cilindros o tambores de PVC, con sustrato de arena.

A lo largo de los meses de duración de la experiencia, las temperaturas oscilaron entre un valor mínimo de 10,3°C, en el mes de diciembre y un máximo de 13,9°C en el mes de marzo (Figura 5.29).

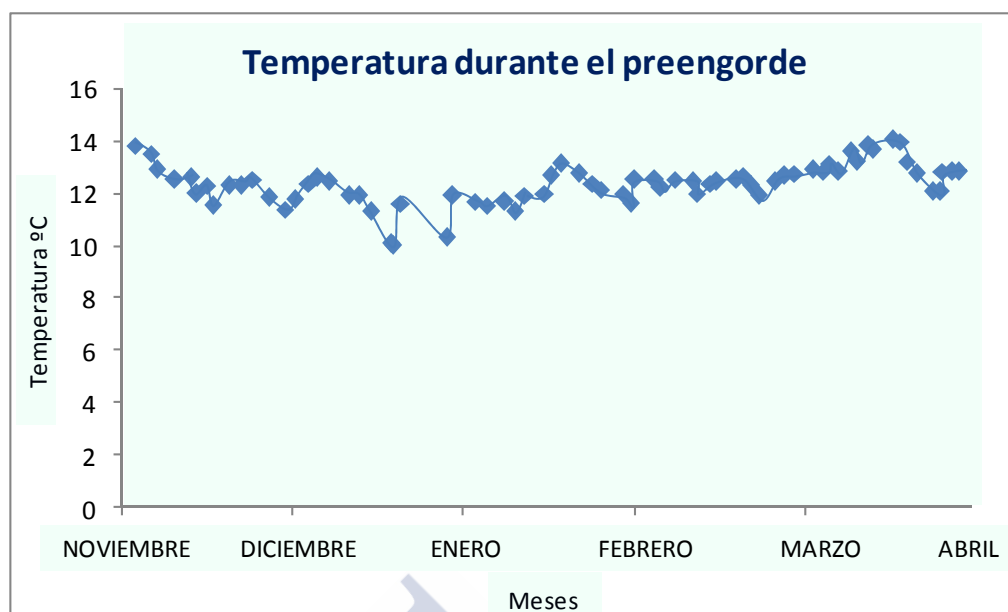


Figura 5.29. Variación de temperatura en la Ría de Ribadeo durante los cinco meses de cultivo en el medio natural.

En cuanto a los resultados obtenidos en la linterna 1 y el tambor 1, en los dos tipos de estructura, los pisos que contenían una cantidad de 30 g y que partían de una talla superior a 3.000 μm , apenas superaron un mes de cultivo. En ambos casos, estos pisos se encontraban ubicados en la parte inferior de cada estructura. La densidad de 40 g, y también de talla superior a 3.000 μm , tampoco superó el mes de cultivo en los tambores y en linterna, sobrevivió únicamente hasta los 4 meses.

Tabla V.5. Crecimiento y supervivencia de la semilla de coquina preengordada durante cinco meses en la Ría de Ribadeo.

	DENSIDAD (g) - TALLA (μm)	Talla inicial (mm)	Talla final (mm)	Supervivencia (%)
Linterna 1	150 g > 2.000 μm	3,14	3,43	13,09
	100 g > 2.000 μm	3,14	3,5	11,12
	DENSIDAD (g) - TALLA (μm)	Talla inicial (mm)	Talla final (mm)	Supervivencia (%)
Linterna 2	200 g > 2.000 μm	3,14	3,49	17,71
	70 g > 2.000 μm	3,14	3,43	17,99
	50 g > 2.000 μm	3,14	3,5	37,09
	DENSIDAD (g) - TALLA (μm)	Talla inicial (mm)	Talla final (mm)	Supervivencia (%)
Linterna 3	110 g > 2.000 μm	3,14	3,91	26,44
	130 g > 2.000 μm	3,14	3,47	21,79
	160 g > 2.000 μm	3,14	4,98	24,54
	175 g > 2.000 μm	3,14	5,61	24,50

Solo sobrevivieron a los cinco meses de preengorde, las densidades de 150 y 100 g en linterna, con unos porcentajes del 13,09% y el 11,12%, respectivamente. La semilla contenida en los tambores con arena, no sobrevivió en ninguno de los casos para completar la etapa de preengorde en ninguna de las densidades experimentales (Tabla V.5).

En cuanto a la linterna 2 y el tambor 2, al igual que en el caso anterior, las densidades menores (30 g), apenas superaron un mes de cultivo en el medio natural. Para la densidad de 40 g en tambores con sustrato, la supervivencia fue de un mes, mientras que en linterna, fue de dos meses.

Con densidades más altas, los resultados fueron más satisfactorios. En el caso de la linterna, los porcentajes de supervivencia para cada rango de talla y densidad fueron los siguientes: 18% en los pisos que contenían 200 y 70 g de semilla mayor de 2.000 μm y un 37% para el piso que contenía 50 g de semilla con talla también superior a 2.000 μm . En el caso del tambor con sustrato, la experiencia de preengorde duró únicamente hasta el mes de febrero para la densidad más alta (70 g).

En la tercera linterna (linterna 3) con semilla de talla superior a 2.000 μm , se ensayaron cinco densidades. La supervivencia varió entre 22 y 26%, sin verse un efecto claro de la densidad. Las máximas tallas finales, al cabo de cinco meses de cultivo, se obtuvieron en los pisos de la linterna donde las densidades iniciales de semilla habían sido más elevadas: 175 g donde se obtuvo una talla final de 5,61 mm y 160 g donde se alcanzó una talla final de 4,98 mm.

El crecimiento de semilla durante el preengorde en los meses de otoño - invierno fue lento. En esta experiencia, se obtuvieron mejores resultados de crecimiento y supervivencia a densidades más altas. Las densidades más bajas no superaron en ninguna de las dos estructuras el primer mes de cultivo.

5.3.2.1.2. Experiencia 2

La mortalidad total de la semilla, mantenida en tambores con sustrato, que impidió completar la experiencia de preengorde, unida a la dificultad de manejo y

limpieza de los mismos llevó a seleccionar la linterna sin sustrato para la siguiente prueba de preengorde. Con el objetivo de evaluar la talla óptima de inicio del cultivo durante esta etapa, se ensayó el preengorde de la coquina en la estructura seleccionada, linterna sin sustrato, en la misma ubicación (Ría de Ribadeo), a densidades elevadas (125 y 150 g) y partiendo de dos rangos de talla (semilla mayor de 2.000 y 3.000 μm).

La temperatura media del agua osciló entre los 20,3°C en el mes de agosto y se mantuvo en torno a los 11°C en los meses de diciembre, enero y febrero (Figura 5.30).

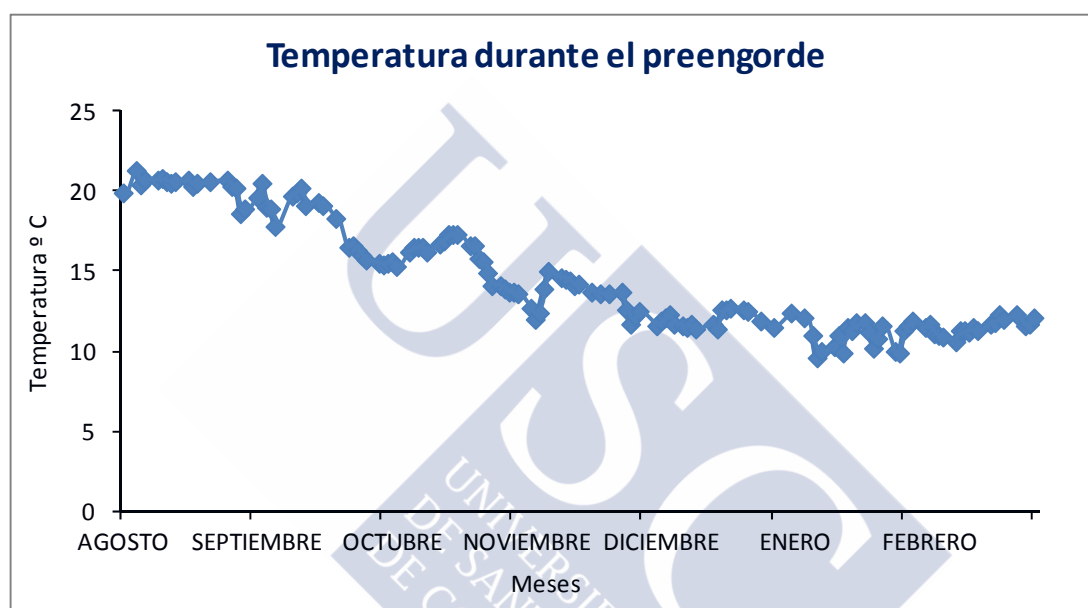


Figura 5.30. Variación de la temperatura en la Ría de Ribadeo durante el preengorde.

Las tallas iniciales de cultivo en esta experiencia fueron de 2,7 mm (semilla mayor de 2.000 μm) y 5,3 mm (semilla retenida en tamiz de malla superior a 3.000 μm). La semilla se mantuvo preengordando durante 7 meses (Figura 5.31). Las tallas finales alcanzadas fueron de 4 mm para aquella que comenzó con talla superior a 2.000 μm y 7,5 mm para la que partió de una talla superior a 3.000 μm . El incremento de talla en ambos casos fue de aproximadamente 2 mm. La principal diferencia entre los dos rangos de talla se encontró en los porcentajes de supervivencia, presentando un 7,68% la semilla que partió con menor talla y un 54,18% en la que partió de una talla de tamiz superior a 3.000 μm .

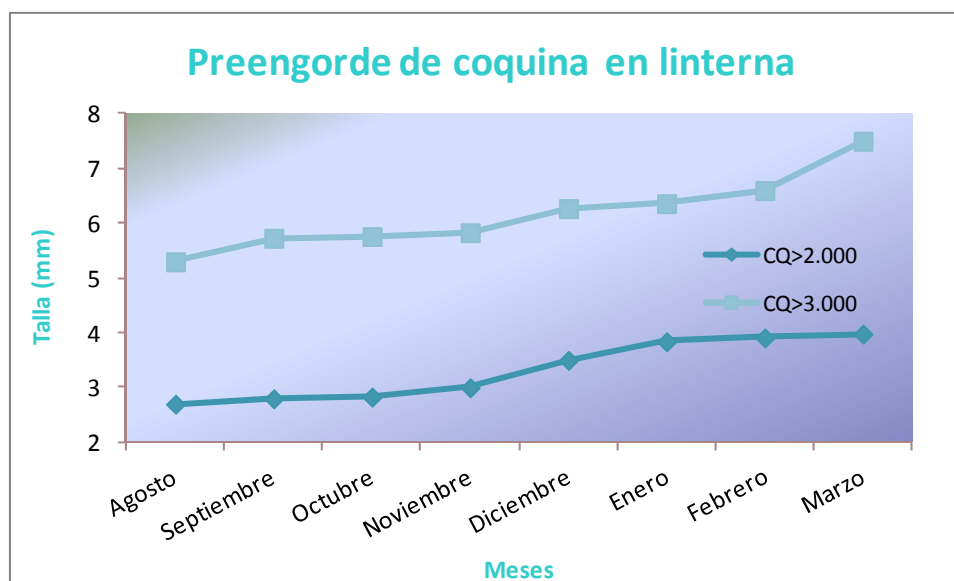


Figura 5.31. Crecimiento en longitud de semilla de *D. trunculus* de dos rangos de talla en la Ría de Ribadeo durante la experiencia de preengorde en linterna.

5.3.2.1.3. Experiencia 3

Otro de los sistemas de preengorde ensayados fueron las linternas con platillos de PVC, suspendidas en batea y ubicadas en el polígono B de Vilagarcía. En esta experiencia se ensayó este tipo de estructura de cultivo, comparando la influencia de la presencia o no de sustrato durante la etapa de preengorde en el medio natural que comenzó en la primavera (mes de abril) y duró 6 meses.

Las temperaturas durante la etapa de preengorde se mantuvieron entre los 14°C y los 18°C (Figura 5.32).

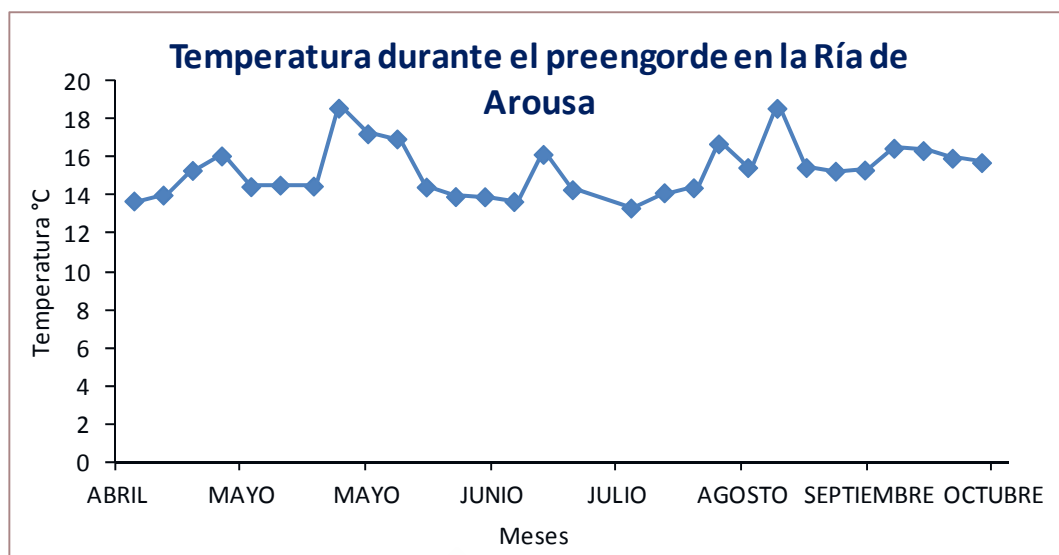


Figura 5.32. Variación de temperatura en la Ría de Arousa durante los meses de preengorde en el medio natural.

En los cuatro rangos de talla estudiados se produjo un mayor crecimiento en aquellos individuos cultivados con sustrato de arena (Tabla V.6). En el caso de la semilla que partió con tallas iniciales mayores a 2.000 μm y 4.000 μm y que se mantuvo sin sustrato de arena, se produjeron episodios de mortalidad a causa de la mejilla que entró en la estructura y acabó matando a la semilla. En cuanto a la supervivencia, los mayores porcentajes (26%; 31% y 23%) corresponden a la semilla que partió con tallas más elevadas (>3.000 μm y >4.000 μm). Dentro de la semilla de coquina que llega al final de la etapa de preengorde, la cultivada sin sustrato, presentó supervivencias algo más elevadas que la que se cultivó con sustrato.

Tabla V.6. Talla de la semilla de *D. trunculus* en mm y porcentajes de supervivencia al final de la experiencia de preengorde en linterna con y sin sustrato.

Tamiz	Talla inicial (mm)	Talla final (mm)	Supervivencia (%)
>2.000 con arena	3,4	11,59	11
>2.000 sin arena	3,4	-	0
>2.500 con arena	4,1	15,66	8
>2.500 sin arena	4,1	13,25	10
>3.000 con arena	6,03	14,26	26
>3.000 sin arena	6,03	14,08	31
>4.000 con arena	7,5	15,08	23
>4.000 sin arena	7,5	-	0

5.3.2.1.4. Experiencia 4

En el mismo mes que comenzó esta experiencia de preengorde en batea en la Ría de Arousa (mes de abril), otro lote de la misma semilla de coquina, se trasladó a una batea experimental ubicada en el puerto deportivo de Camariñas para ser preengordada en cubos de polietileno de flujo forzado. Las cantidades y tallas medias iniciales, se muestran en la siguiente tabla.

Tabla V.7. Talla media inicial y cantidad de semilla de *D. trunculus* para preengorde en cubos de polietileno con flujo forzado de agua en batea experimental en el puerto de Camariñas.

Tamiz	Gramos (g)	Talla inicial (mm)
>4.000	246	7,5
>3.000	2.121	6,0
>2.500	1.378	4,1
>2.000	185	3,4

Se dispuso toda la semilla junta en un contenedor ubicado en dicha batea, la cantidad total inicial fue de 3.930 g y mensualmente se sacó para limpiarla y pesarla. Tras un mes de preengorde en el medio natural, mes de mayo, el crecimiento de la semilla provoca un incremento en peso, llegando a un total de 4.180 g.



Figura 5.33. (A-C). Semilla de *D. trunculus* tras un mes de preengorde en Camariñas.

A los dos meses de preengorde en esta ubicación, en el mes de junio, la semilla alcanzó un peso total de 6.010 g. Durante este mes, comenzó a observarse a la vez mortalidad asociada a la presencia de semilla de mejillón que, en etapas iniciales, se introdujo en la estructura y comenzó a perjudicar a la semilla de coquina. Debido a este motivo, la semilla se trasladó de nuevo al Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo donde se separó de la mejilla que afectó fundamentalmente a los individuos de menor talla.

Finalmente, en el mes de julio, una vez separada la coquina de la mejilla, se hizo un conteo y medidas finales. En total, sobrevivieron 79.666 individuos con un peso de 6.088 g (Tabla V.8). La supervivencia final en esta experiencia de preengorde fue de un 48,5%.

Tabla V.8. Talla media final y cantidad de semilla de *D. trunculus* tras tres meses de preengorde en cubos con flujo forzado en Camariñas.

Tamiz	Gramos (g)	Talla final (mm)
>4.000	4.784	9,2
>3.000	1.051	6
>2.500	253	5,7

5.3.2.1.5. Experiencia 5

Los mismos cubos de polietileno con flujo forzado de agua, se utilizaron para preengorde en un pantalán ubicado en el puerto de O Vicedo (Lugo).

En el mes de julio, comenzó la experiencia de preengorde en el medio natural y se colocó en el pantalán semilla de coquina de varios rangos de talla (Tabla V.9).

Tabla V.9. Talla media inicial y cantidad de semilla de *D. trunculus* para preengorde en cubos con flujo forzado en O Vicedo.

Tamiz	Nº Individuos	Gramos (g)	Talla inicial (mm)
>4.000	72.541	6.733	7,2
>3.000	28.350	782	5,7
>2.500	3.957	35	5,4
>2.000	436.472	6.531	3,8
>1.500	131.870	441	2,6

5. Cultivo en criadero y en el medio natural

Durante estos tres meses, las temperaturas en el pantalán de O Vicedo se mantuvieron en torno a los 18°C.

El último conteo de la semilla de coquina preengordada en este sistema y ubicación, se realizó a finales de septiembre. Quedaban en los contenedores las siguientes tallas y cantidades (Tabla V.10).

Tabla V.10. Talla media final y cantidad de semilla de *D. trunculus* tras tres meses de preengorde en cubos con flujo forzado en O Vicedo.

Tamiz	Nº Individuos	Gramos (g)	Talla final (mm)
>4.000	15.677	1.455	8,2
>3.000	110.341	3.045	5,4
>2.000	196.144	2.935	3,9



Figura 5.34. (A-C). Semilla de *D. trunculus* durante el período de preengorde en O Vicedo.

La cantidad total de semilla que se introdujo en O Vicedo en este sistema fue de 673.190 individuos. Tras tres meses de preengorde quedaron 322.162 unidades, por lo que la supervivencia en esta experiencia fue de un 48%.

5.3.2.1.6. Siembra directa de semilla en el banco natural de origen de los reproductores

Las estructuras utilizadas para el preengorde de la coquina mediante siembra directa en el sustrato, se mantuvieron en la misma ubicación durante los cinco meses de duración de la experiencia.

En la figura 5.35 se muestra la variación de salinidad, temperatura, pH y oxígeno disuelto a lo largo de los cinco meses de la experiencia en “O Lombo das Navallas” (O Barqueiro).

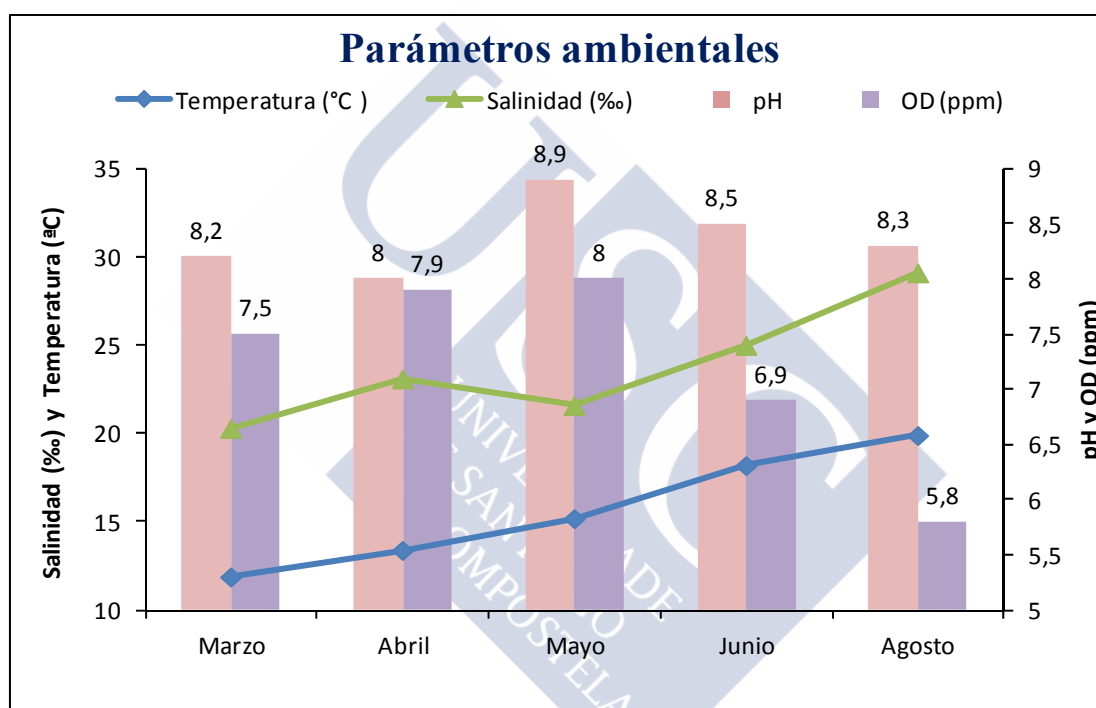


Figura 5.35. Variación de los parámetros ambientales durante la experiencia en el medio natural.

La coquina, con una talla inicial de 7,5 mm y 0,05 g de peso, alcanzó una talla media de 22 mm y un peso de 1,5 g al cabo de 5 meses de cultivo en el medio natural (Figuras 5.36 y 5.37). En cuanto a la relación talla – peso, la ecuación de regresión sigue un modelo potencial (Figura 5.38).

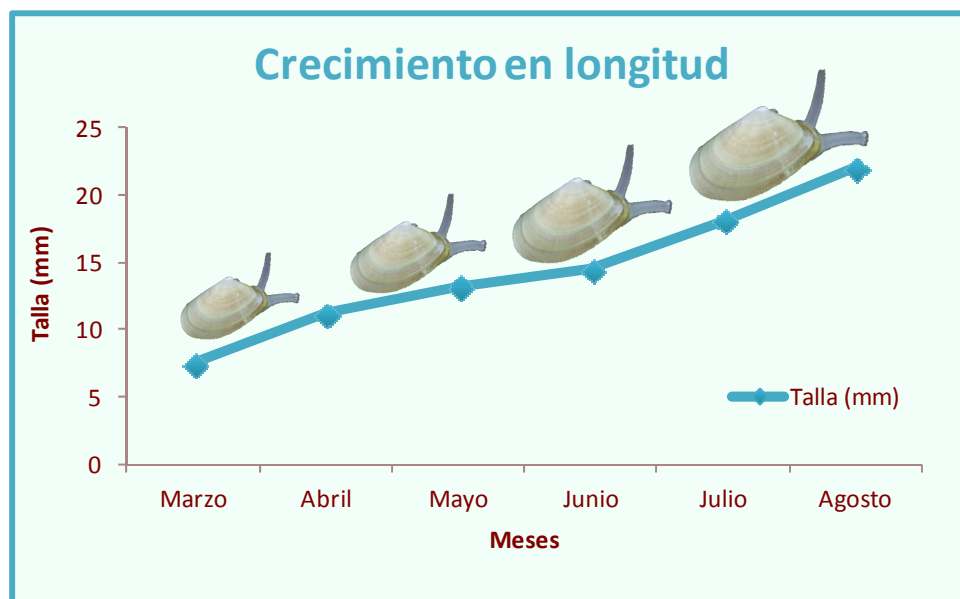


Figura 5.36. Crecimiento en longitud de *D. trunculus* durante la etapa de preengorde.



Figura 5.37. Crecimiento en peso de *D. trunculus* durante la etapa de preengorde.

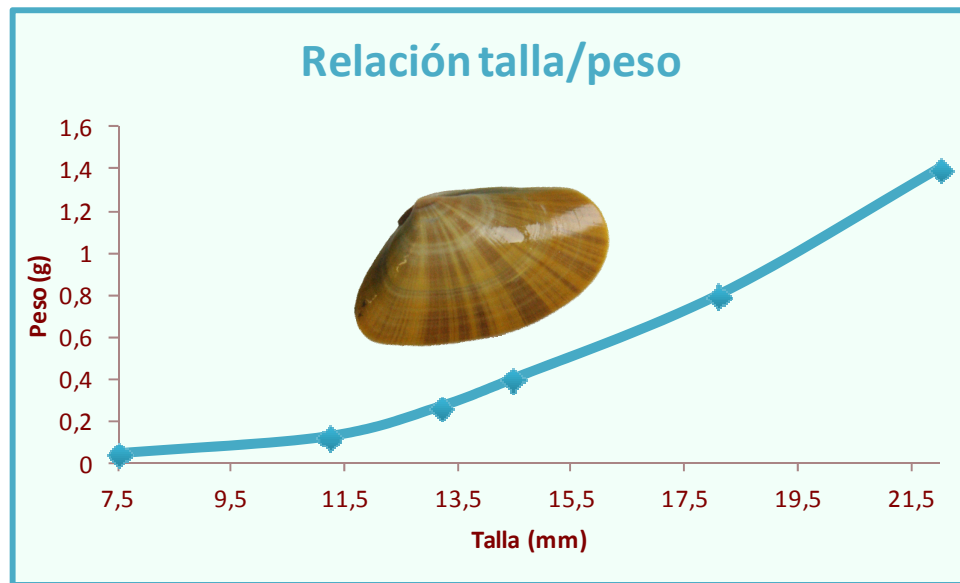


Figura 5.38. Relación talla-peso de la coquina durante la etapa de preengorde.

La supervivencia tras el primer mes fue de un 13%. En este momento, la semilla tenía una talla de aproximadamente 11 mm y a lo largo de los cuatro meses sucesivos, la supervivencia se mantuvo en el 100%.

La experiencia duró hasta el mes de agosto, momento a partir del cual se perdió la referencia de la muestra, de modo que no se pudo continuar con el estudio.



Figura 5.39. Coquina de 22 mm engordada en jaula en el banco de “O Lombo das Navallas” en O Vicedo.

5.4. DISCUSIÓN

Partiendo de reproductores del banco natural de Vilarrube (NO Galicia), se obtuvieron desoves en criadero coincidiendo con la etapa de madurez de esta especie en el medio natural que abarcó cinco meses (de marzo a julio). Ahora bien, se pudo adelantar este período, alrededor de un mes, realizando un acondicionamiento en criadero.

Con los resultados obtenidos, se considera viable el acondicionamiento de *Donax trunculus* en criadero, así como la obtención de desoves fuera de su período natural de puesta; 21°C es la temperatura donde se acelera más el proceso de maduración gonadal, aunque los elevados porcentajes de mortalidad experimentados a esta temperatura, llevan a seleccionar 17°C como temperatura óptima para un acondicionamiento, asegurando la supervivencia de los progenitores en el criadero durante un período de tiempo más prolongado.

En la mayoría de los bivalvos, el incremento de la temperatura durante el acondicionamiento favorece el proceso de vitelogénesis (Robinson, 1992). Ojea *et al.* (2008), observaron una evolución en el desarrollo gonadal más acusada en los individuos tratados a mayor temperatura en el acondicionamiento de *Ruditapes decussatus*. También Delgado y Pérez-Camacho (2007), estudiando la maduración en las almejas *R. decussatus* y *Ruditapes philippinarum*, encontraron que a 18°C las dos especies maduran antes que a 14°C.

Para la obtención de desoves o puestas, el método que resultó más eficaz fue el mantenimiento de reproductores en seco durante períodos de tiempo aproximado de 10 horas, para su posterior introducción en agua de mar filtrada a 18°C. En el caso de que no se obtuvieran desoves, se realizaron inducciones por choques térmicos (13°C y 25°C). Esta facilidad de obtención de puestas coincide con *Venerupis corrugata* (Cervíño-Otero, 2011) aunque los choques térmicos en esta especie, son menos bruscos al llegar a una temperatura de 20°C como máximo.

En las especies de bivalvos como *R. decussatus* (Ojea *et al.*, 2008), *R. philippinarum* (Aranda *et al.*, 2010), *E. siliqua* y *S. marginatus* (da Costa y Martínez-Patiño, 2009; da Costa *et al.*, 2011a), las inducciones se consiguen empleando también el método de choques térmicos. Martínez-Patiño (2013) hace una recopilación de las condiciones de la inducción a la puesta para todas estas especies, a partir de la cual se puede generalizar (independientemente de la diferencia en los tiempos y en el número de ciclos) que los choques serán de agua fría, con temperaturas de 10°C a 14°C y de agua caliente, con temperaturas de 18°C a 27°C, dependiendo de la especie.

Además de esto, en todas las especies y en *D. trunculus*, como técnica para incrementar el estímulo de puesta, es común la adición de gametos procedentes de disección gonadal de individuos maduros. Otros autores que describen resultados satisfactorios en la inducción a la puesta, dentro de la familia Donacidae, son: Chanley (1969) y Moñeza (1975) que utilizaron la inyección en gónada de hidróxido de amonio en *D. variabilis* y *D. trunculus*, respectivamente.

El número medio de ovocitos emitidos por hembra en las experiencias realizadas con esta especie, fue de 800.000, oscilando entre un mínimo de 600.000 y un máximo de un millón de huevos. Los resultados son diferentes en otras especies, así en *V. corrugata*, la cantidad media de huevos emitidos por cada hembra es algo menor (500.000 ovocitos) (Nóvoa, 2007; Cerviño-Otero, 2011) y en *R. decussatus*, la variabilidad de las puestas obtenidas fue muy grande, oscilando entre valores de 0,36 y 1,9 millones de huevos por hembra (Ojea *et al.*, 2008).

En la figura 5.40 se hace una recopilación de los datos obtenidos en diferentes cultivos larvarios de especies de moluscos bivalvos como: *R. decussatus* (Martínez *et al.*, 2001; Aranda *et al.*, 2009, 2014a); *E. siliqua* (da Costa *et al.*, 2010b); *E. magnus* y *S. marginatus* (Martínez *et al.*, 2002; da Costa, 2009); *R. philippinarum* (Martínez *et al.*, 2008) y *V. corrugata* (Nóvoa 2007; Martínez *et al.*, 2008; Cerviño-Otero, 2011), de esta forma, se podrían comparar con los de *D. trunculus*.

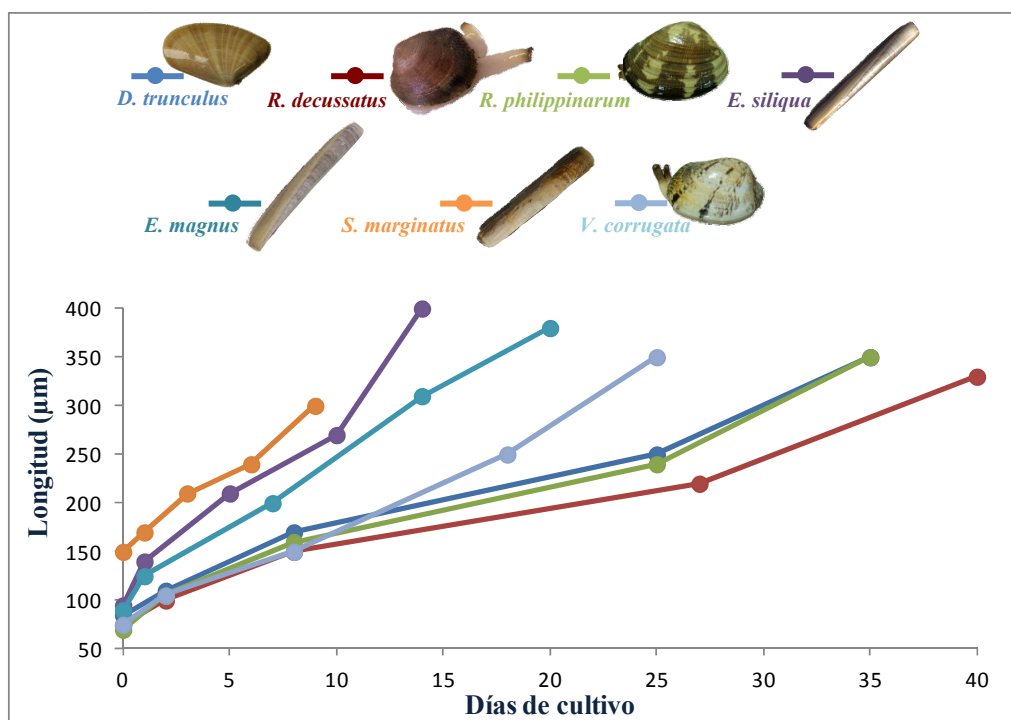


Figura 5.40. Talla en (μm) desde la etapa de huevo hasta la fase de postlarva de las especies de bivalvos cultivadas en el Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo.

El tamaño medio de los ovocitos oscila entre las 75 y 85 micras, son por tanto parecidos al de especies como *R. decussatus* de 62-68 μm (Ojea *et al.*, 2008), *R. philippinarum* con 65-70 μm (Martínez *et al.*, 2008), *V. corrugata* con 65-75 μm (Cerviño-Otero, 2011) y *E. magnus* 70-90 (da Costa, 2009; da Costa *et al.*, 2011a) y de menor tamaño que las especies *E. siliqua* y *S. marginatus* que pueden alcanzar tallas de hasta 75-90 y 143-155 micras, respectivamente (da Costa, 2009; da Costa y Martínez-Patiño, 2009).

El porcentaje medio de transformación de huevo a larva D en *D. trunculus* fue de un 57%. En las especies *E. siliqua*, *E. magnus* y *S. marginatus* este porcentaje se mantuvo en torno a un 80% (da Costa, 2009), al igual que en *V. corrugata* (Cerviño-Otero, 2011). Sin embargo en la almeja fina, *R. decussatus*, el porcentaje de transformación de huevo a larva D fue menor que en la coquina, de aproximadamente un 40% (Aranda *et al.*, 2014b).

Esta transformación a larva D, tiene lugar a las 41 horas, por lo que es más lenta que la observada en especies como: *S. marginatus* (12 horas); *E. siliqua* (24 horas); *R. decussatus* (26 horas); *V. corrugata* y *E. magnus* (30 horas). Sin embargo alcanza el

estadio de larva umbonada a los 8 días, tiempo que coincide con *R. decussatus* y *V. corrugata* pero es más tardío que las especies de solénidos puesto que, en *S. marginatus* aparece a los 3 días, *E. siliqua* a los 5 días y *E. magnus* a los 7 días.

En la coquina aparece el pie entre los 20 y 25 días. En la almeja babosa llega a este estadio de larva pediveliger entre los 16 y 18 días (Cerviño-Otero, 2011). En las tres especies de solénidos, la aparición del pie, tiene lugar entre los 5 y los 14 días de cultivo (da Costa, 2009).

El desarrollo larvario de la coquina, tiene una duración aproximada de un mes. En experiencias realizadas en el Centro de Cultivos Mariños con las mismas condiciones de cultivo, *R. decussatus* presentó un período larvario de similar duración (Ojea *et al.*, 2008). En *V. corrugata*, *S. marginatus*, *E. siliqua* y *E. magnus*, la etapa de cultivo larvario es mucho más corta siendo de 22-25; 8; 14 y 20 días, respectivamente (da Costa *et al.*, 2012b). *V. philippinarum* tiene un desarrollo larvario de 13-14 días (Zhang y Yan, 2006).

Durante el cultivo larvario, el crecimiento de la coquina *D. trunculus*, se corresponde a un modelo lineal con un patrón de crecimiento de 5,49 $\mu\text{m}/\text{día}$. En otras especies también se observó este ajuste a modelos lineales, pero los crecimientos son mayores. Así, *V. corrugata* es de 7,65 $\mu\text{m}/\text{día}$ (Cerviño-Otero, 2011) y las especies de solénidos *E. magnus*, *E. siliqua* y *S. marginatus* son de 13 $\mu\text{m}/\text{día}$ y de 16 $\mu\text{m}/\text{día}$.

En *D. trunculus*, el cultivo de postlarvas hasta semilla de 3 mm en nuestras instalaciones, tuvo una duración aproximada de 90 días, durante este tiempo, el crecimiento en longitud de la especie siguió un patrón lineal con un crecimiento diario de 0,04 mm/día partiendo de tallas superiores a las 350 μm . El porcentaje medio de supervivencia fue de un 35%, oscilando entre un valor mínimo del 13% y una supervivencia máxima del 55%. En *V. corrugata* la supervivencia en esta fase de cultivo, también a los 90 días y en las mismas instalaciones, fue de entre el 30% y el 50% (Cerviño-Otero, 2011) pero siguiendo un patrón exponencial. En los solénidos (*E. magnus*, *E. siliqua* y *S. marginatus*), con morfología algo diferente, las supervivencias a los 120 días fueron menores, de un 2-5% y alcanzando tallas de 20-30 mm (da Costa *et al.*, 2012b).

De las estructuras ensayadas para el preengorde en la coquina, la que mejor funcionó fueron los cubos de polietileno con sistema de flujo forzado de aire. Estas estructuras se consideran un sistema adecuado para el cultivo de semilla de coquina, puesto que permiten albergar elevadas cantidades de semilla con una talla inicial de preengorde diferente, asegurando unos óptimos porcentajes de supervivencia (alrededor del 48% en este estudio) y un correcto crecimiento de la misma. El preengorde en las estructuras de cultivo en Camariñas, estuvo afectado por la fijación e invasión de semilla de mejillón, aunque se puede prevenir con una limpieza más frecuente de las estructuras o un desdoble de cada contenedor. También se obtuvieron buenos resultados con estas mismas estructuras en el preengorde de *V. corrugata*, *R. decussatus* y *R. philippinarum* (De Santiago *et al.*, 2007, 2008, 2010). García-Fernández *et al.* (2001) demostraron en *Ostrea edulis*, *R. decussatus* y *V. corrugata* que, en otro tipo de estructuras (tubos de metacrilato sumergidos), la inyección de aire forzando la corriente de agua de mar en el medio natural, tiene resultados positivos y puede constituir un avance en el preengorde de moluscos bivalvos en las Rías Gallegas.

Dentro de los parámetros de cultivo, la densidad es uno de los factores que más influencia tiene en el crecimiento y en la mortalidad de los moluscos bivalvos. Las experiencias realizadas pusieron de manifiesto que el preengorde a bajas densidades no resulta de éxito en la especie *D. trunculus*, siendo las densidades más altas a las que sobrevivieron durante más tiempo. A diferencia de esta, en la almeja fina Martínez *et al.* (1997) encontraron que a una densidad excesiva, el crecimiento puede llegar a detenerse y a producir altos porcentajes de mortalidad. En cualquier caso, aunque las densidades óptimas sean diferentes para las distintas especies en un determinado sistema de cultivo, también existen diversos factores a tener en cuenta como la ubicación, las condiciones ambientales y la talla inicial de la semilla. Así Cerviño-Otero (2011), con semilla de *V. corrugata* de talla superior a 3,5 mm, obtuvo diferentes resultados según los sistemas de cultivo y su ubicación, siendo en las bateas, en donde encontró mayores tasas de crecimiento aunque durante el invierno esta tasa se ralentizaba.

La influencia de las condiciones ambientales en el crecimiento de los bivalvos ha sido discutida por numerosos autores, siendo los parámetros más importantes la temperatura y el alimento (Bayne y Newell, 1983). La coquina presentó un bajo patrón de crecimiento en los meses de invierno, por lo que un preengorde en los meses de

primavera-verano, con temperaturas más elevadas y mayor disponibilidad de fitoplancton en la columna de agua, han podido favorecer el crecimiento y supervivencia de la semilla.

Con la semilla de coquina, con una talla inicial de entre 7 y 8 mm, se hizo una siembra directamente en sustrato en el banco natural de O Lombo das Navallas en la Ría de O Barqueiro, en el mes de marzo. Al cabo del primer mes, aunque las mortalidades fueron elevadas (87%), el crecimiento de las que lograron sobrevivir fue alto llegando a alcanzar una talla de aproximadamente 11 mm. En los meses sucesivos, la supervivencia se mantuvo en el 100%. Se puede considerar que las altas mortalidades de este primer mes, bien pueden ser por la adaptación al medio o por la talla inicial de siembra (Ansell, 1972); aunque solo se pudo hacer el seguimiento hasta los 5 meses, la semilla alcanzó una talla media de 22 mm. El crecimiento de la coquina fue de aproximadamente 3 mm/mes, superior al obtenido en la almeja fina (2,24 mm/mes) por Villegas *et al.* (2001) en el norte de Asturias y *Donax serra* Laudien *et al.* (2003).

En esta etapa de cultivo de la coquina, la dificultad para hacer el seguimiento hasta llegar a la talla comercial (35 mm) reside en el complicado mantenimiento de las estructuras en una misma ubicación. Las jaulas con armazón de acero con las que se realizó la experiencia fueron arrastradas por las corrientes, perdiendo por completo su referencia al quedar sepultadas bajo la arena. En el mismo banco de estudio, se ensayaron con anterioridad diferentes sistemas de mantenimiento de la semilla como cajas de madera de 20 cm de altura o tablas del mismo material que se disponían acotando la zona de siembra y a su vez, se fijaban con estacas que también servían como punto de referencia, pero la fuerte hidrodinámica de la zona y el movimiento de sustrato que ello conlleva, traía como resultado una pérdida de las estructuras haciendo imposible su seguimiento (Martínez, comunicación personal). Existen autores que proponen un marcaje de individuos de la familia Donacidae empleando distintas técnicas: la primera, empleada en la especie *Donax hanleyanus* Philippi, 1847 consistió en el uso de la calceína, que es un marcador fluorescente de baja toxicidad que permite identificar individuos sembrados previamente en el medio natural pasado un determinado período de tiempo (Herrmann *et al.*, 2009); otra de las técnicas, empleada en *Donax serra* consistió en el uso de placas metálicas adheridas a la concha del bivalvo que permitían recuperar los ejemplares utilizando un detector de metales, tras un

determinado tiempo de permanencia en el medio natural (Dugan y McLachlan, 1999). Un sistema de marcaje adecuado en *D. trunculus*, podría ser la solución para el seguimiento de los individuos en el banco de siembra.

Considerando que la coquina alcanzó en el criadero los 7,5 mm a los 11 meses desde la puesta y que, con esta talla, una vez sembrada en el medio natural, se consiguieron medir individuos de 22 mm de media a los 5 meses. Se calculó la tasa de crecimiento en longitud (Winberg, 1971), en base a la siguiente expresión: $GL_{30} = ((\ln 22 - \ln 7,5) \times 30 \times 100) / 150$. Obtenido este valor ($GL_{30} = 21$), se pudo estimar el tiempo necesario para crecer hasta los 35 mm (talla comercial) aplicando la misma fórmula: $21 = ((\ln 35 - \ln 7,5) \times 30 \times 100) / n^\circ \text{ días}$. Para alcanzar la talla comercial, esta especie necesitaría 7,5 meses desde que sale del criadero (con una talla de 7,5 mm) por lo tanto, desde la obtención de la puesta necesitaría 18,5 meses aproximadamente (11 meses + 7,5 meses). Estos resultados son intermedios a los obtenidos por Cerviño-Otero (2011), realizando los mismos cálculos para el cultivo integral de *V. corrugata* puesto que, en 18 meses se completa su preengorde en un sistema en suspensión y en 26 meses con sistemas intermareales. Sin embargo da Costa (2009), al realizar el seguimiento en jaulas de *S. marginatus*, encuentra que esta especie alcanza la talla comercial (80 mm) a los tres años de vida y estos datos concuerdan con los obtenidos por Martínez-Patiño (comunicación personal) para la misma especie en recintos controlados. En cualquier caso estos datos teóricos pueden variar, dependiendo de la realidad ambiental del medio y condiciones en las que se hallen los individuos puesto que, por una parte, la experiencia fue en primavera-verano, cuando el crecimiento es máximo, debido a mayor temperatura y disponibilidad de alimento pero en invierno el crecimiento tiende a ser mucho menor; por otra parte, hubo una fuerte mortalidad inicial que redujo drásticamente la densidad y, por último, los individuos pasan su primera maduración durante la experiencia, pero al siguiente año la maduración va a ser mucho mayor y van a crecer menos.

Con todos los resultados obtenidos en las distintas fases, se puede afirmar que existe la posibilidad de obtener semilla de *D. trunculus* en criadero y sembrarla en el medio natural para llegar a su talla comercial; por lo tanto, partiendo de reproductores en estado de madurez (de marzo a julio) del banco natural de Vilarrube (NO Galicia), se

obtuvieron desoves en criadero pero además, fue posible su acondicionamiento manteniendo a los individuos adultos a unas temperaturas de 21°C y 17°C.

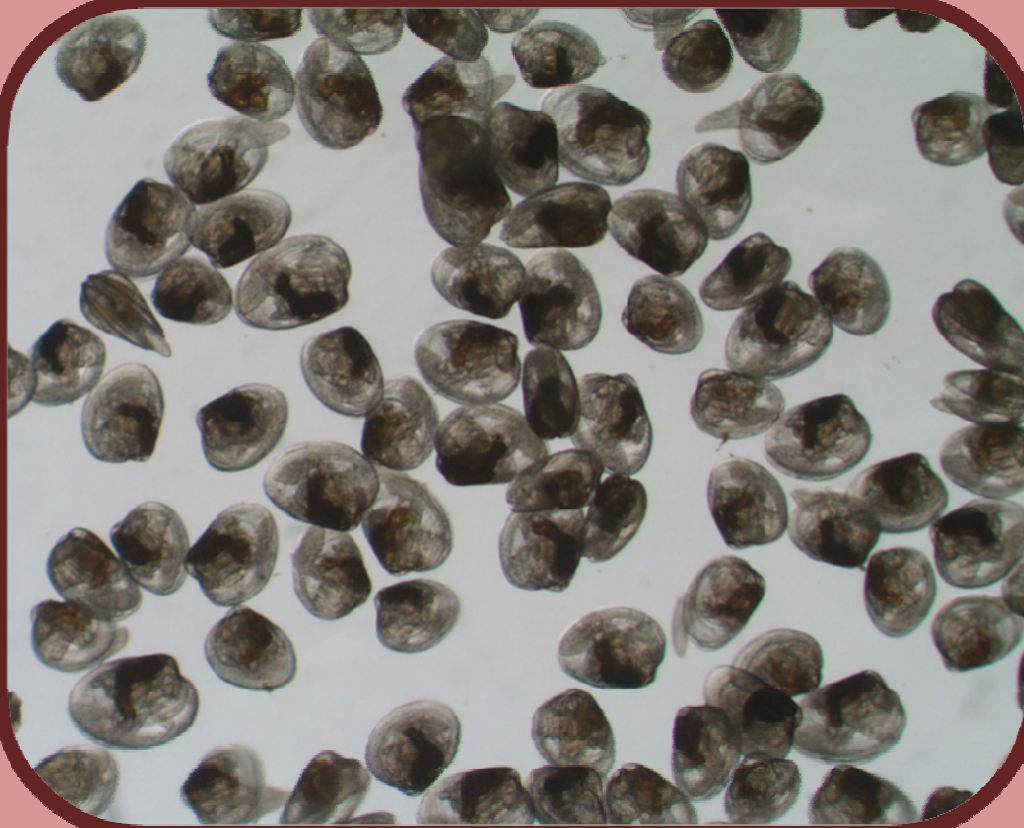
La obtención de desoves es bastante simple con un tratamiento en seco seguido de inmersión a 18°C. El porcentaje medio de transformación de huevo a larva D en *D. trunculus* es de un 57% y el desarrollo larvario de la coquina tiene una duración aproximada de un mes.

El cultivo de postlarvas hasta semilla de 3 mm tiene una duración de unos 90 días. Su preengorde en el medio natural es más efectivo en primavera-verano y en sistemas de flujo forzado de aire, durando aproximadamente unos 7 meses, obteniendo tras la siembra directa de semilla en el medio natural, individuos de una talla media de 22 mm en 5 meses.





6. Capítulo IV. Bioquímica de los desarrollos larvarios





6. CAPÍTULO IV. BIOQUÍMICA DE LOS DESARROLLOS LARVARIOS

6.1. INTRODUCCIÓN

Los moluscos bivalvos, desde la fase de ovocito fecundado hasta alcanzar la etapa de postlarva, pasan por diferentes estadios. El paso de una fase larvaria a otra conlleva una serie de cambios estructurales, así como cambios en su composición bioquímica mayoritaria y metabolismo energético, que son necesarios para hacer frente a todas las transformaciones que tienen lugar durante el desarrollo.

De todos los componentes bioquímicos mayoritarios, el papel de las proteínas, los lípidos y los carbohidratos durante el desarrollo embrionario y larvario, varía en función de la especie. Da Costa (2009), en los solénidos *Ensis arcuatus*, *Ensis siliqua* y *Solen marginatus*, describe las proteínas como el componente bioquímico mayoritario durante el desarrollo embrionario y posteriormente, a lo largo del desarrollo larvario, desde larva D hasta la fijación. En *Ruditapes decussatus*, las proteínas y los lípidos fueron los principales constituyentes en larvas, independientemente del régimen alimenticio, mientras que los carbohidratos aparecieron en menor proporción (Matias *et al.*, 2011). En *Mytilus galloprovincialis*, los lípidos son considerados como principal fuente de energía durante la embriogénesis (Sánchez-Lazo y Martínez Pita, 2012) y Haws *et al.* (1993) en especies de ostra, afirman que son los carbohidratos los que deben jugar un papel en la óptima utilización de reservas.

Durante el desarrollo larvario en los bivalvos, existen dos etapas relacionadas con la incorporación de nutrientes. La primera o fase lecitotrófica, transcurre durante el período embrionario, en la que los individuos viven a expensas de reservas vitelinas y está directamente relacionada con la calidad de los reproductores. La otra fase, denominada exotrófica o planctotrófica, suele comenzar en la larva D, momento en que la alimentación pasa a ser exógena, por lo que el fitoplancton se convierte en la principal fuente de alimentación de las larvas.

Existen autores que describen en algunas especies, una fase intermedia o mixotrófica en la cual la larva comienza a tomar alimento exógeno a la vez que va terminando sus reservas vitelinas. Se describe esta fase de transición en especies como: *Mytilus edulis* (Lucas *et al.*, 1986); *Pecten maximus* (Delaunay, 1992; Soudant, 1995); *Crassostrea gigas* (Rico-Villa *et al.*, 2009); *E. arcuatus* y *S. marginatus* (Da Costa, 2009), otros autores en las larvas de almeja babosa, no observan un claro período mixotrófico (Nóvoa, 2007).

Según lo expuesto, el desarrollo larvario desde la fase de larva D en bivalvos, está estrechamente relacionado con la cantidad y calidad de fitoplancton. Estos dos factores repercuten en las tasas de crecimiento, la supervivencia y la duración de la fase larvaria.

Las microalgas, para ser utilizadas como alimento, deben presentar características determinadas como son: forma y tamaño adecuados para una correcta ingestión, una fina pared celular para favorecer la digestión y no ser tóxicas para las larvas. Si cumplen los requisitos anteriormente citados, la calidad nutricional va a depender de su composición bioquímica. Existen autores que en algunas especies, consideran el papel de carbohidratos y lípidos como esenciales (Enright *et al.*, 1986), sin embargo otros autores como Webb y Chu (1982), puntualizan que la importancia de la alimentación suministrada depende más de otros nutrientes (ácidos grasos, aminoácidos, monosacáridos, minerales y vitaminas) que de la composición bioquímica general.

A la hora de realizar un aporte alimenticio externo, ha de valorarse el uso de dietas microalgales monoespecíficas o dietas mixtas que combinen varias especies. En general, los casos en los que se empleó para la alimentación de bivalvos marinos una sola especie de fitoplancton (régimen monoespecífico), los resultados de crecimiento de las larvas en diferentes especies fueron variables, así, en *Crassostrea gigas*, *Venerupis philippinarum* y *Pecten maximus*, se obtuvieron buenos resultados en cuanto a crecimiento y supervivencia, con una dieta constituida únicamente por *Chaetoceros* sp. (Marshall *et al.*, 2010).

En este trabajo se optará por la combinación de varias especies de microalgas en la dieta dado que, una dieta mixta, incrementa las posibilidades de alcanzar un equilibrio nutricional.

El éxito en el crecimiento y supervivencia larvarias, no solo depende del aporte de alimento, sino también de la capacidad de los individuos de asimilar los nutrientes, incrementando las reservas energéticas y del poder de movilizarlas para hacer frente a los cambios morfológicos y estructurales.

Los principales cambios morfológicos en el desarrollo de bivalvos ocurren durante la embriogénesis y la metamorfosis. En estas etapas, los organismos marinos dependen de los niveles de energía que almacenan y estos niveles energéticos, intervienen no solo en todos los procesos metabólicos que provocan los cambios estructurales a los que están sujetos sino que, contribuyen al mantenimiento de los individuos en períodos de ayuno.

El éxito de la metamorfosis debe atribuirse en parte, a la acumulación de reservas de energía durante el desarrollo larvario y a la capacidad para movilizar sustratos que garanticen sus necesidades metabólicas (Haws *et al.*, 1993). La importancia de los diferentes compuestos bioquímicos, como fuente de energía en esta etapa, sigue siendo controvertido (Knauer y Southgate, 1999). Por lo tanto, además de conocer los sustratos energéticos o los componentes bioquímicos mayoritarios (proteínas, lípidos y carbohidratos) que intervienen en todos los procesos del desarrollo larvario, es preciso conocer cuál es su contribución al acúmulo y movilización de reservas energéticas a lo largo de esta etapa.

El metabolismo energético y las tasas de utilización de las reservas endógenas en los estadios larvarios de invertebrados marinos, han sido objeto de estudio de diferentes autores (Crisp, 1974; Holland, 1978; Gallager *et al.*, 1986; Anger *et al.*, 1989; Shilling y Manahan, 1994; Marsh *et al.*, 2001; Sánchez-Lazo y Martínez Pita, 2012).

Un organismo vivo funciona como un sistema que recibe y cede energía y materia al ambiente que lo rodea. En este sentido Morowitz (1968) estableció que no es la energía *per se* la que hace posible la vida, sino el flujo de esta a través del sistema.

Los organismos heterótrofos realizan la biosíntesis (anabolismo) gracias a la energía que obtienen de la materia orgánica consumida (catabolismo). La unión del catabolismo y el anabolismo constituyen el metabolismo.

Sin embargo, la energía no es esa materia orgánica constituida por proteínas, lípidos y carbohidratos, sino que es más bien, el producto final de su oxidación y metabolización. Todas estas sustancias orgánicas en los organismos, liberan calor por combustión siendo fuentes potenciales de energía. Esta puede determinarse directamente en una bomba calorimétrica midiendo el calor de combustión liberado o estimarse a partir de los niveles de proteínas, lípidos y carbohidratos y de sus respectivos coeficientes oxicalóricos: 23,6; 39,5 y 17,2 kJ/g (National Research Council (NRC), 1993).

En este trabajo se realizó un estudio de la evolución de los contenidos energéticos de los distintos estadios larvarios de *Donax trunculus*, para intentar comprender su metabolismo y el uso selectivo de los diferentes sustratos bioquímicos, no solo de forma absoluta, sino también en términos energéticos durante su desarrollo larvario, al exponerla a distintas dietas y al someterla a regímenes de ayuno.

Se sabe que en larvas de bivalvos, la capacidad de sobrevivir al ayuno varía entre especies (His y Seaman, 1992). La resistencia de los individuos a períodos de ayuno durante el período larvario y el movimiento de reservas energéticas durante esta etapa fueron estudiados por: Labarta *et al.* (1999) en *Ostrea edulis*; Matias *et al.* (2011) en *R. decussatus* y Margarete-Ramos *et al.* (2010) en *D. trunculus*.

Los estudios de ayuno en bivalvos, suelen tener como objetivo comprobar la resistencia de ciertas especies a la ausencia de alimento, bien por no estar este disponible en el medio o por tratarse de momentos en los que el individuo está sometido a cambios morfológicos que le impiden una correcta captación de alimento exógeno. En este caso, el estudio de ayuno en esta especie no solo se hizo por estos motivos, también se trata de ver qué componentes bioquímicos se movilizan o consumen, así como conocer su metabolismo energético en estas condiciones.

Por todo lo expuesto, este capítulo solo pretende conocer las evoluciones en la composición bioquímica mayoritaria (carbohidratos, lípidos y proteínas) a lo largo del desarrollo larvario de la coquina hasta larva postmetamórfica; establecer la alimentación óptima o más adecuada de la especie mediante el ensayo de diferentes dietas microalgales pluriespecíficas para mejorar sus crecimientos y momento de la metamorfosis y describir la evolución, movilización y consumo de sus componentes bioquímicos mayoritarios durante períodos de ayuno.



6.2. MATERIAL Y MÉTODOS

6.2.1. Seguimiento de la evolución bioquímica de los desarrollos larvarios

Se hizo un seguimiento del desarrollo larvario de seis desoves de coquina (P₁; P₂; P₃, P₄; P₅ y P₆) obtenidos a lo largo de dos anualidades. La procedencia de cada lote de progenitores, la fecha de llegada al criadero de los mismos, así como la fecha en que tuvieron lugar los desoves, se especifica en la tabla VI.1.

Tabla VI.1. Procedencia de los progenitores, mes de recogida de la muestra y fecha de obtención de los desoves de *D. trunculus*.

AÑO	PROCEDENCIA PROGENITORES	FECHA DE LLEGADA DE PROGENITORES AL CRIADERO	DESOVES	FECHA DE DESOVE
2009	Vilarrube	22-abril	P ₁	21-mayo
	Abrela	27-abril	P ₂	28-mayo
	Vilarrube	28-mayo	P ₃	29-mayo
2010	Vilarrube	20-abril	P ₄	22-abril
	Vilarrube	20-abril	P ₅	06-mayo
	Vilarrube	20-abril	P ₆	20-mayo

De cada uno de los desarrollos se tomaron muestras de la fase de ovocito, larva premetamórfica y larva postmetamórfica. En este estudio, las condiciones de cultivo han sido las explicadas en el apartado material y métodos del cultivo larvario correspondiente al capítulo 3, de cultivo en criadero de *D. trunculus*, y los días en los que se recogieron las muestras figuran en la tabla VI.2.

Tabla VI.2. Intervalo de días y valor medio del número de días, desde la obtención de ovocitos, en los que se recogieron las muestras a lo largo de los seis desarrollos larvarios de *D. trunculus*.

	Días	Media (días)
Ovocito	0	0
Larva premetamórfica	21-26	23
Larva postmetamórfica	26-37	32

Tratamiento de las muestras

Para obtener el número de individuos necesario para cada analítica, se recogieron larvas u ovocitos en un recipiente de volumen conocido y se agitaron para una total homogeneización. Se tomaron cinco alícuotas, las cuales se depositaron en

portaobjetos excavados y se contaron en una lupa. A partir de la media de las cinco alícuotas, se obtuvo el número de individuos del cultivo en cada momento. Para la obtención de datos de crecimiento (largo y ancho), se tomaron muestras semanalmente y un total de 100 individuos se midieron en un analizador de imagen NIS-Elements BR 3.0 de Nikon, acoplado a un microscopio óptico Nikon Labophot-2.

El estudio del peso seco y composición bioquímica en cada fase de desarrollo, se realizó tomando seis muestras por estadio y desove en tubos centrífuga previamente tarados, en los cuales se introdujo un número de individuos conocido. Una vez añadido el volumen correspondiente al número de individuos deseado, los tubos se introdujeron depositados los individuos en el fondo del tubo, se eliminaron los restos de sobrenadante con una pipeta Pasteur y se congelaron las muestras para una posterior liofilización. La realización de este proceso se llevó a cabo en un Liofilizador Virtis Advantage, introduciendo las muestras congeladas en la cámara de vacío y de esta forma, conseguir la separación del agua por sublimación y por lo tanto, su eliminación. Una vez liofilizadas se mantuvieron en desecador durante 1 hora para luego pesarlas en balanza de precisión Sartorius MC 210S (D.E.=0,01 mg). Después se conservaron en un congelador hasta realizar los análisis bioquímicos.

Se realizó un análisis de la mezcla de fitoplancton (*Tetraselmis suecica*, *Isochrysis* sp., *Diacronema lutheri*, *Chaetoceros* sp.) que sirvió de alimentación de las larvas. Tras un conteo del número de células de fitoplancton, se somete a centrifugación un volumen de la mezcla (correspondiente a un número determinado de células), obteniéndose un precipitado de microalgas, que se lavó con una solución de formiato de amonio al 3%, se congeló y liofilizó, para su posterior analítica.

6.2.2. Prueba de alimentación

Se ensayaron tres dietas con larvas D de cuatro días de un mismo desove a las que previamente se alimentaron con la dieta mixta utilizada habitualmente. Los cultivos larvarios se hicieron por triplicado, utilizando tanques troncocónicos de 50 litros, con agua de mar filtrada a una temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$ y con aireación constante. La densidad inicial fue de 10 larvas/mL.

6. Bioquímica de los desarrollos larvarios

La alimentación se hizo diariamente con una cantidad constante de 50 equivalentes (número de células de microalgas por volumen de cultivo expresado en μL) y se ensayaron 3 dietas (Tabla VI.3).

Tabla VI.3. Composición de las dietas suministradas y proporción de cada una de las especies.

Dieta	Composición de la dieta	Proporción
D1	<i>Isochrysis galbana</i> y <i>Diacronema lutheri</i>	1:1
D2	<i>I. galbana</i> , <i>D. lutheri</i> y <i>Chaetoceros</i> sp.	2:1:1
D3	<i>I. galbana</i> , <i>D. lutheri</i> y <i>Chaetoceros</i> sp.	1:1:2

Las especies de fitoplancton utilizadas son cultivadas en un sistema continuo, descrito en el capítulo 3 de cultivo en criadero, que se basa en un aporte constante de agua mar con el medio nutritivo y en la obtención de la cosecha de microalgas también de forma constante (50-80L/día/bolsa).

Tratamiento de las muestras

Coincidiendo con los cambios de agua, se tomaron muestras de aproximadamente 100 larvas que se observaban al microscopio óptico para determinar los cambios morfológicos y para medir las larvas. Coincidiendo con estos cambios, también se realizó un conteo de los individuos a lo largo del desarrollo larvario para calcular la supervivencia.

En esta prueba, las muestras para determinar la composición bioquímica de los individuos se tomaron en el momento inicial del experimento (larva D de cuatro días), en el estadio de larva premetamórfica y en el estadio de larva postmetamórfica, de la misma forma descrita anteriormente y en los días expuestos en la tabla VI.4.

Tabla VI.4. Intervalo de días y valor medio del número de días, desde la obtención de ovocitos, en los que se recogieron las muestras a lo largo de los desarrollos larvarios de *D. trunculus* alimentadas con las tres dietas.

	Días	Media (días)
Larva D	4	4
Larva premetamórfica	18-23	21
Larva postmetamórfica	22-28	25

Se realizó el análisis de la mezcla de fitoplancton constituyente de cada una de las dietas suministradas, al inicio del experimento y dos veces más durante su duración, siguiendo la misma metodología descrita en el apartado anterior.

6.2.3. Prueba de ayuno

Durante la prueba de ayuno los cultivos desde la fase de ovocito, se mantuvieron sin ningún aporte de alimento en dos tanques troncocónicos de 50 litros, con agua de mar filtrada a una temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$ y aireación constante durante una semana aproximadamente.

En este caso, las muestras para análisis bioquímico, se tomaron diariamente y por duplicado, además se controlaron la mortalidad y el crecimiento.

6.2.4. Métodos bioquímicos

Los métodos de análisis de carbohidratos, lípidos y proteínas utilizados en cada una de las experiencias se detallan en las figuras 6.1; 6.2 y 6.3. Se incluye la metodología empleada en la determinación de carbohidratos y proteínas de un modo más esquemático por haber sido ya explicada en el apartado de material y métodos del capítulo 1, referente al ciclo gametogénico.

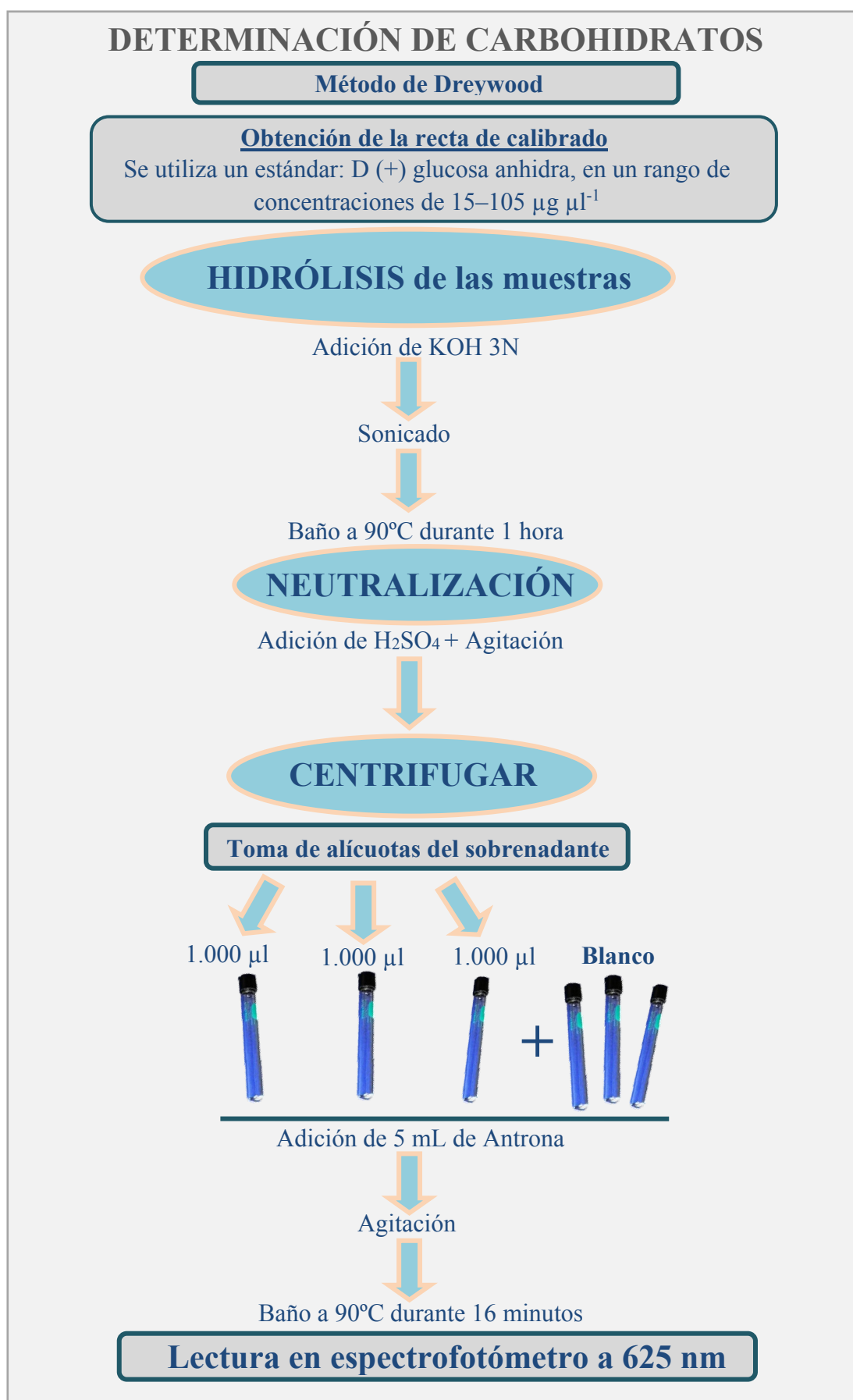


Figura 6.1. Esquema del método de Dreywood para la determinación de carbohidratos totales.

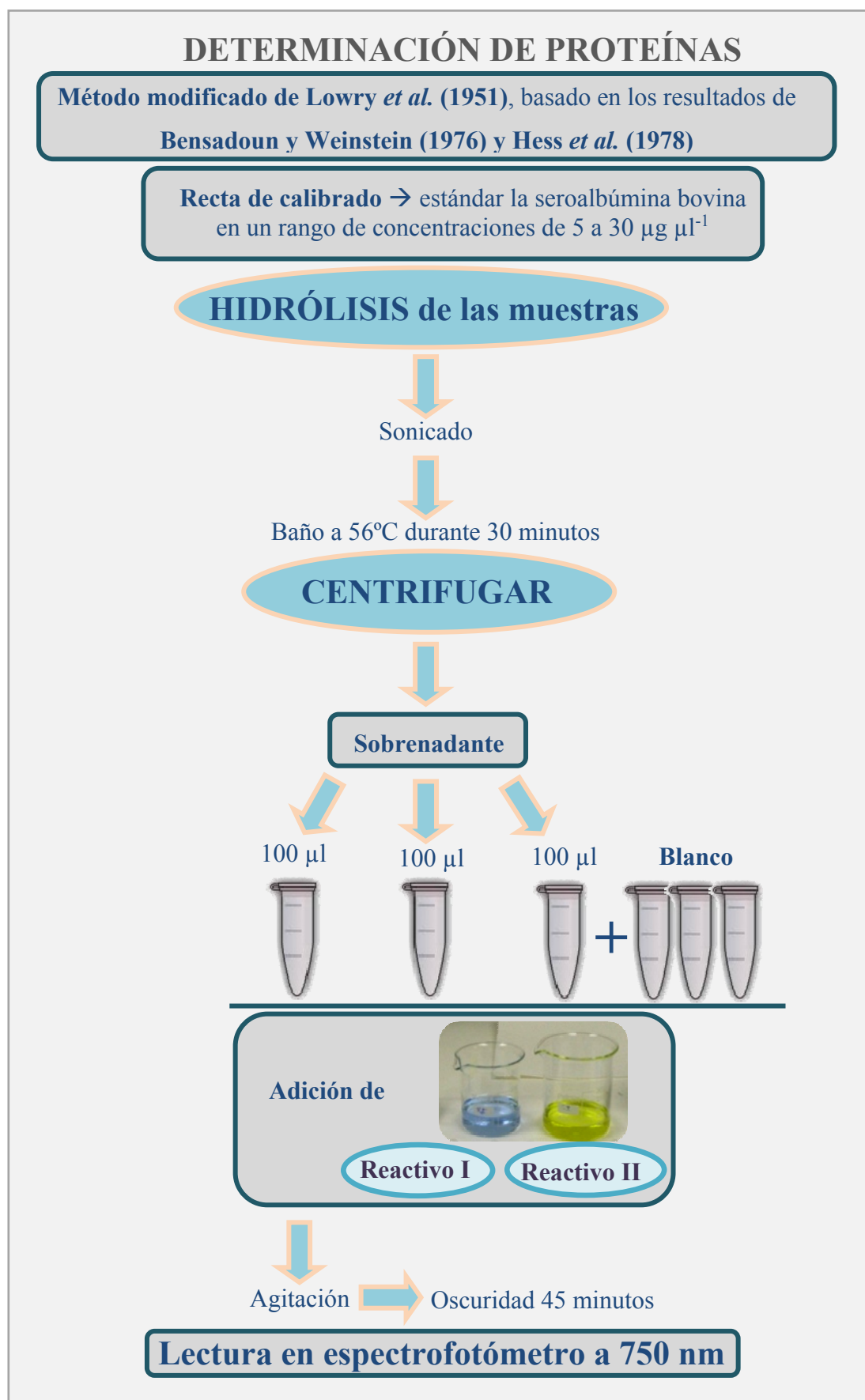


Figura 6.2. Esquema del método modificado de Lowry para la determinación de proteínas.



Figura 6.3. Esquema del método de Marshall y Weinstein para la determinación de lípidos.

6.2.5. Cálculo de los contenidos energéticos

Los cálculos energéticos se hicieron partir de los niveles de proteínas, lípidos y carbohidratos y de sus respectivos coeficientes oxicalóricos que, en este trabajo, fueron: 18,0 kJ g⁻¹ para las proteínas; 35,24 kJ g⁻¹ para lípidos y 17,16 kJ g⁻¹ para carbohidratos. Estos mismos coeficientes fueron usados por Beukema y De Bruin (1979) en la especie *Macoma balthica* y por Matias *et al.* (2011), en *R. decussatus*.

6.2.6. Tratamiento de datos y análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos, se utilizó el paquete estadístico SPSS® para Windows versión 15.0.

La agrupación de los datos en el estudio de los desarrollos larvarios se realizó en los siguientes grupos: ovocito, premetamórfica y postmetamórfica. En el caso de los experimentos con las dietas de microalgas, además de los grupos de larvas de 4 días, premetamórfica y postmetamórfica, también se hizo un grupo de las dietas objeto de estudio.

En los desarrollos larvarios, la comparación de medias de las longitudes de ovocitos, larvas pre- y post-metamórficas y de sus composiciones bioquímicas, se utilizó el Análisis de Varianza (ANOVA). Previamente se estudió la normalidad de las muestras mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas se comprobó mediante el test de Levene. Cuando fue necesario, se aplicaron análisis *post hoc* con test MDS. El estudio estadístico anterior fue el mismo en los ensayos con las dietas de microalgas. En este caso, se compararon los componentes bioquímicos de dichas dietas y asimismo esta composición bioquímica se comparó con las medias de las longitudes, la composición bioquímica de las larvas pre- y postmetamórficas y la supervivencia de fijación.

Para realizar las mismas comparaciones pero, con los datos expresados en porcentajes, en primer lugar, los valores se transformaron según la transformación angular, con una función arcoseno (Sokal y Rohlf, 1995). La función arcoseno estira las

colas de la distribución de porcentajes y comprime el medio. Una vez transformados los datos, se compararon mediante ANOVAs según se ha descrito anteriormente.

En la obtención de las correlaciones que permiten asociar la longitud, supervivencia hasta la fijación y composiciones bioquímicas de los ovocitos o larvas de 4 días y los estadios de larvas pre- y postmetamórficas se utilizó el test paramétrico de Pearson donde se señaló con un asterisco (*) la correlación significativa con un intervalo de confianza del 95% y con dos asteriscos (**), la correlación significativa al 99% de confianza.



6.3. RESULTADOS

6.3.1. Seguimiento de la evolución bioquímica de los desarrollos larvarios

La alimentación diaria de los 6 cultivos larvarios estudiados, se basó en una dieta mixta de las microalgas: *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, *Isochrysis aff. galbana* (T-iso), *Diacronema lutheri*, *Chaetoceros neogracile* y *Chaetoceros muelleri*, cultivadas en sistema continuo.

La composición bioquímica de la dieta aportada se especifica en la tabla VI.5, donde se observa que las proteínas fueron el componente mayoritario (57,8%).

Tabla VI.5. Composición en proteínas, lípidos y carbohidratos, en porcentaje de materia orgánica total y picogramos por célula, de la dieta suministrada a los seis desarrollos larvarios.

	PROTEÍNAS				LÍPIDOS				CARBOHIDRATOS			
	%	Desv.	pg/cél	Desv.	%	Desv.	pg/cél	Desv.	%	Desv.	pg/cél	Desv.
DIETA	57,8	1,1	29,5	0,9	30,9	0,7	15,8	0,1	11,2	0,5	5,7	0,2

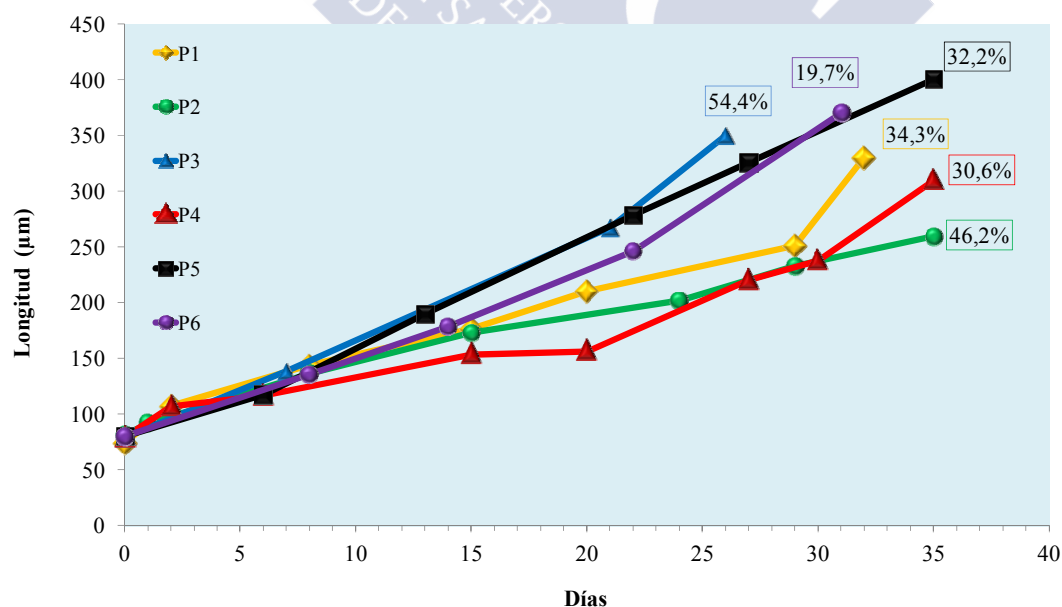


Figura 6.4. Evolución de seis desarrollos larvarios. Crecimiento en longitud (µm) y porcentaje de supervivencia.

En los desarrollos larvarios, los ovocitos presentaron una talla media de 79 μm , las larvas premetamórficas 237 μm (a los 23 días de media) y las postmetamórficas una talla de 337 μm (día 32) (Fig. 6.4). Estas tallas, entre las distintas fases del desarrollo, presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$). Los porcentajes de supervivencia, hasta alcanzar la etapa de postlarva, oscilaron entre 19,7 y 54,4%, coincidiendo este último porcentaje con el desarrollo que alcanzó en un menor tiempo (26 días), la fase postmetamórfica (Fig. 6.4).

En cuanto a la composición bioquímica, el componente mayoritario en los ovocitos y larvas pre- y post-metamórficas fueron las proteínas, a estas le siguieron los lípidos y los carbohidratos presentaron una menor proporción (Tabla VI.6)

Las proteínas, el componente principal, presentaron un porcentaje inicial en los ovocitos de un 71,3%, este valor ascendió ligeramente a un 72,4% en la larva premetamórfica y disminuyó hasta un 61,5% en la larva postmetamórfica (Fig. 6.5). Se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ovocitos y larvas postmetamórficas y entre larvas premetamórficas y postmetamórficas.

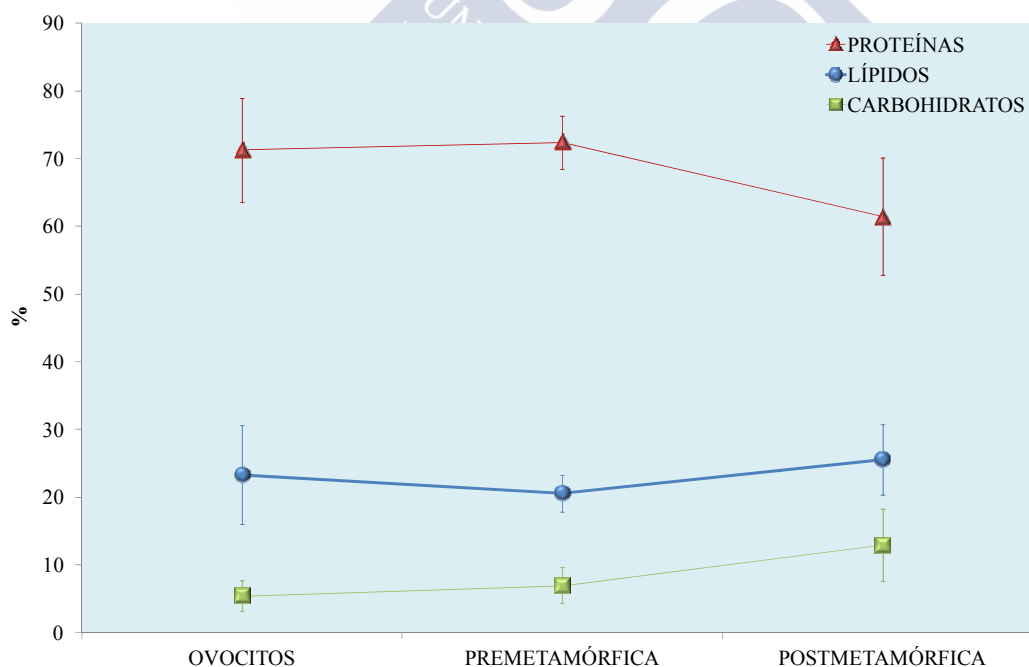


Figura 6.5. Contenido medio en carbohidratos, lípidos y proteínas en ovocitos, larvas premetamórficas y larvas postmetamórficas, expresado en porcentaje de materia orgánica total.

Los lípidos siguieron un comportamiento contrario al de las proteínas desde la fase de ovocito, con un porcentaje de un 23,3%, cayeron ligeramente a un 20,6% en la

larva premetamórfica, para aumentar a un 25,6% en la postmetamórfica (Fig. 6.5). Las variaciones en porcentaje lipídico entre estadios fueron significativas, con un intervalo de confianza del 95% entre ovocitos y larvas premetamórficas y entre larvas premetamórficas y postmetamórficas.

Los ovocitos de *D. trunculus* presentaron un porcentaje de carbohidratos (componente minoritario) del 5,4%, la larva premetamórfica de un 7,0% y la postmetamórfica de un 13,0% (Fig. 6.5). Su evolución, al igual que en las proteínas, presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ovocitos y larvas postmetamórficas y entre las premetamórficas y postmetamórficas.

Tabla VI.6. Composición bioquímica en ovocitos y larvas premetamórficas y larvas postmetamórficas de seis puestas de *D. trunculus*. Valores por puesta y valores medios con desviación estándar expresados en ng/individuo (n=12).

		PROTEÍNAS		LÍPIDOS		CARBOHIDRATOS	
		ng/ind.	Desv.	ng/ind.	Desv.	ng/ind.	Desv.
OVOCITOS	P1	47,6	4,1	13,7	0,6	1,4	0,03
	P2	37,3	3	7,2	0,3	2,2	0,1
	P3	32,9	0,7	7,3	0,5	3,5	0,1
	P4	16,5	0,4	7,7	0,4	1	0,1
	P5	15,9	0,2	8,9	0,3	2,1	0,1
	P6	12,7	0,6	4,1	0,2	1,1	0,1
MEDIAS		27,1	14,1 ^c	8,2	3,1 ^c	1,9	0,9 ^c
PREMETAMÓRFICA	P1	548,5	86,1	149,3	6,9	52,0	2,7
	P2	371,9	13,3	80,3	3,4	20,1	1,5
	P3	502,2	35,5	151,7	25,6	74,3	4,8
	P4	293,6	0,8	83,2	1,9	14,8	0,5
	P5	615,1	2,2	229	2,9	64,3	0,3
	P6	497,6	24,6	131,9	5,4	65,8	0,2
MEDIAS		471,5	118,1 ^a	137,6	54,7 ^b	48,6	25,2 ^b
POSTMETAMÓRFICA	P1	323,9	13,3	216,3	8,7	116,5	0,7
	P2	202	5,7	82,3	1,9	19,6	0,4
	P3	524,6	72,3	212,2	8	152,6	8,2
	P4	515,1	1	118,1	3,2	55,5	1,8
	P5	475,3	4,2	204,1	4,8	150,2	1,5
	P6	448,0	1,7	198,3	7,4	73	0,2
MEDIAS		414,8	126,8 ^b	171,9	57 ^a	94,6	53,9 ^a

Las letras distintas indican diferencias significativas al 95% de confianza entre los valores medios de los estadios de los desarrollos estudiados.

En los ovocitos, el aporte energético de las proteínas fue de 0,49 mJ ind.⁻¹, ascendiendo notablemente a 8,49 mJ ind.⁻¹ en la larva premetamórfica para volver a descender ligeramente en la postmetamórfica con un valor de 7,47 mJ ind.⁻¹ (Tabla VI.7). El aporte energético lipídico fue aumentando a medida que avanzó el desarrollo, pasando de valores de 0,29 mJ ind.⁻¹ en los ovocitos, hasta un 6,06 mJ ind.⁻¹ en las larvas postmetamórficas (Tabla VI.7). Del mismo modo que el aporte lipídico, la evolución del aporte energético de los carbohidratos también aumentó, partiendo de 0,03 mJ ind.⁻¹ en ovocitos, hasta 1,62 mJ ind.⁻¹ en el estadio de larva postmetamórfica (Tabla VI.7).

Tabla VI.7. Contenido energético (mJ ind.⁻¹) total y de las principales reservas (proteínas, lípidos y carbohidratos) y utilización de la energía (variaciones en mJ ind.⁻¹ y en %) durante distintas fases del desarrollo larvario en *D. trunculus*. Los equivalentes energéticos son 18,0 kJ g⁻¹ para las proteínas; 35,24 kJ g⁻¹ para lípidos y 17,16 kJ g⁻¹ para carbohidratos.

	PROTEÍNAS		LÍPIDOS		CARBOHIDRATOS		Total	Variación del Total	
	mJ ind. ⁻¹	Variación	mJ ind. ⁻¹	Variación	mJ ind. ⁻¹	Variación	mJ ind. ⁻¹	mJ ind. ⁻¹	%
OVOCITOS	0,5		0,3		0,03		0,8		
PREMET.	8,5	7,9	4,9	4,6	0,8	0,8	14,2	13,4	1653,6
POSTMET.	7,5	-1,0	6,1	1,2	1,6	0,8	15,2	0,9	6,91

El componente que más energía aporta, desde ovocito a postlarva, fueron las proteínas (54,6%), le siguieron los lípidos (37,2%), estando los carbohidratos en última posición (8,3%) (Figura 6.6).

La variación total o final en las proteínas fue de un aumento de 48,7%, la de los lípidos de 40,2% y la de los carbohidratos de 11,1% (Figura 6.7).

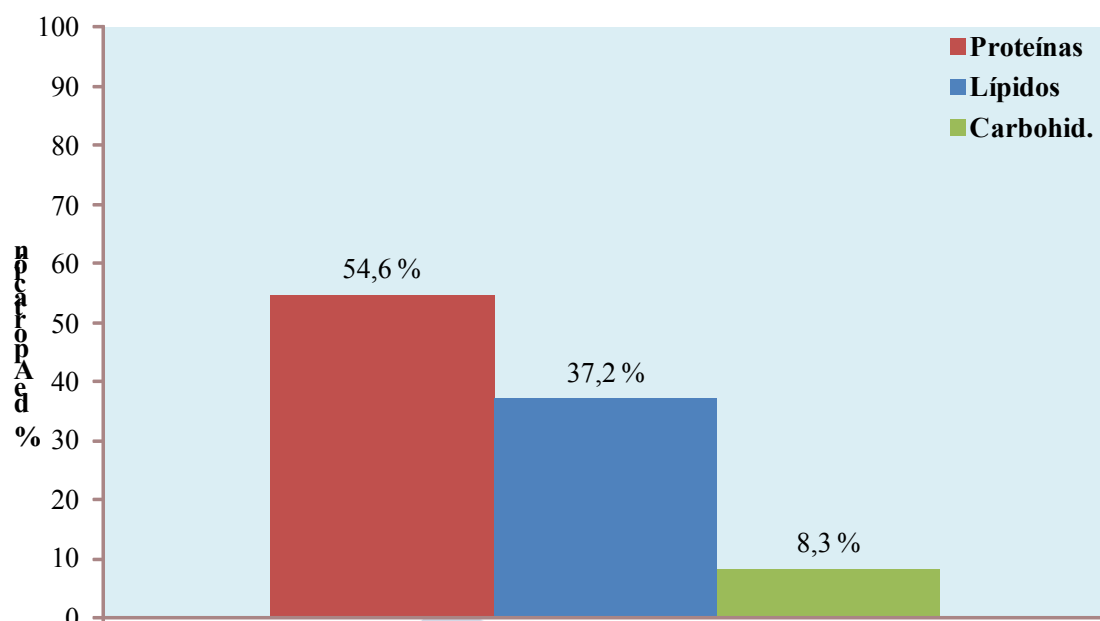


Figura 6.6. Porcentaje de aportación, en el contenido energético total (mJ indi.-1), de cada una de las principales reservas (proteínas, lípidos y carbohidratos) desde ovocito a postlarva de *D. trunculus*.

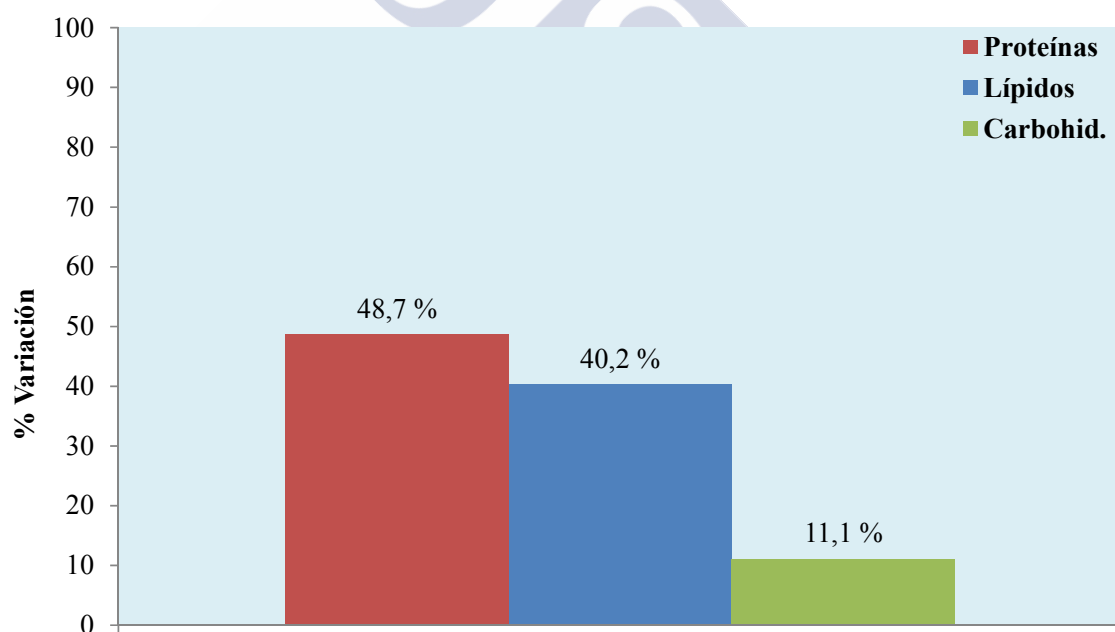


Figura 6.7. Variación total, en porcentaje del contenido energético de cada una de las principales reservas (proteínas, lípidos y carbohidratos) desde huevo a postlarva de *D. trunculus*.

El estudio de la correlación entre la composición bioquímica (proteínas, lípidos y carbohidratos) y otros parámetros que intervienen en el cultivo como el tamaño y la supervivencia hasta la fijación, permiten conocer la influencia de la composición bioquímica mayoritaria en el comportamiento de las larvas (Tabla VI.8). La cantidad de proteínas del ovocito se relacionó negativamente con su tamaño y con la de las larvas

6. Bioquímica de los desarrollos larvarios

pre- y postmetamórficas. Se observó una correlación positiva, con un intervalo de confianza del 99%, entre el contenido en carbohidratos y proteínas en el ovocito y la supervivencia de fijación, lo cual sugiere que a mayor cantidad de proteínas y carbohidratos presentes en el ovocito, mayor es la supervivencia en la fijación. Los contenidos en carbohidratos, lípidos y proteínas de las larvas premetamórficas, presentaron una correlación positiva con la talla de las larvas postmetamórficas.

Tabla VI.8. Coeficiente de correlación de Pearson entre las composiciones bioquímicas (ng/ind.), el tamaño (μm) y el porcentaje de supervivencia de fijación de los ovocitos y de las larvas premetamórficas y postmetamórficas.

		OVOCITO				PREMETAMÓRFICA				POSTMETAMÓRFICA			
		OL	P	L	C	OL	P	L	C	OL	P	L	C
OVOCITO	OL	1	-0.62**	-0.83**	0.26	0.25	-0.32	-0.18	-0.18	-0.03	0.06	-0.53**	-0.37*
	P	-0.62**	1	0.72**	0.25	-0.59**	0.05	-0.16	-0.10	-0.60**	-0.62**	0.03	0.02
	L	-0.83**	0.72**	1	-0.1	-0.29	0.27	0.26	-0.05	-0.34*	-0.27	0.26	0.33*
	C	0.26	0.25	-0.1	1	0.42*	0.24	0.25	0.43**	-0.18	0.08	0.18	0.45**
PREMETAMÓRFICA	OL	0.25	-0.59**	-0.29	0.42*	1	0.6**	0.79**	0.76**	0.69**	0.69**	0.62**	0.76**
	P	-0.32	0.05	0.27	0.24	0.6**	1	0.86**	0.8**	0.55**	0.09	0.8**	0.76**
	L	-0.18	-0.16	0.26	0.25	0.79**	0.86**	1	0.75**	0.56**	0.31	0.75**	0.85**
	C	-0.18	-0.10	-0.05	0.43**	0.76**	0.8**	0.75**	1	0.73**	0.40*	0.90**	0.81**
POSTMETAMÓRFICA	OL	-0.03	-0.6**	-0.34*	-0.18	0.69**	0.55**	0.56**	0.73**	1	0.56**	0.72**	0.46**
	P	0.06	-0.62**	-0.27	0.08	0.69**	0.09	0.31	0.40*	0.57**	1	0.44**	0.53**
	L	-0.53**	0.03	0.26	0.18	0.62**	0.8**	0.75**	0.90**	0.72**	0.44**	1	0.86**
	C	-0.37*	0.02	0.33*	0.45**	0.76**	0.76**	0.85**	0.81**	0.46**	0.53**	0.86**	1
SUP Fj		0.09	0.5**	0.13	0.75**	-0.03	-0.06	-0.08	-0.01	-0.53**	-0.14	-0.13	0.15

OL: Longitud; P: Proteínas; L: Lípidos; C: Carbohidratos; Sup Fj: Supervivencia de fijación. **Negrita:** Correlación significativa; *: al 95% de confianza; **: al 99% de confianza; sin asteriscos: diferencias no significativas.

6.3.2. Prueba de alimentación

El componente bioquímico mayoritario en las 3 dietas fueron los lípidos siendo, en la dieta 1, el que presentó una mayor cantidad (50,4%: Tabla VI.9). En la

composición expresada en pg/cél, se observaron diferencias significativas ($p<0,05$) entre el contenido en proteínas de la dieta 1 y las dietas 2 y 3 (Tabla VI.9). En cuanto a los porcentajes, se observaron diferencias significativas ($p<0,05$) entre las dietas 1 y 3 y entre las dietas 2 y 3 (Tabla VI.9). En el contenido en lípidos, expresado en pg/cél, se observaron diferencias significativas ($p<0,05$) entre las 3 dietas (Tabla VI.9). Las dietas 1 y 2 presentaron un porcentaje de lípidos significativamente mayor al de la dieta 3 (Tabla VI.9). Por último, en la composición en carbohidratos, expresada tanto en porcentaje como en pg/cél, no se observaron diferencias significativas ($p<0,05$) entre las tres dietas (Tabla VI.9).

Tabla VI.9. Composición bioquímica de las dietas empleadas expresada en porcentaje de la materia orgánica total y en picogramos por célula.

	PROTEÍNAS				LÍPIDOS				CARBOHIDRATOS			
	%	Desv.	pg/cél	Desv.	%	Desv.	pg/cél	Desv.	%	Desv.	pg/cél	Desv.
DIETA 1 Ig, D1 (1:1)	40,8	3,1 ^a	7,7	0,1 ^a	50	2,5 ^a	9,6	1,1 ^a	9,1	1,1	1,8	0,4
DIETA 2 Ig, D1, Cht (2:1:1)	40,9	2,7 ^a	6,6	0,7 ^b	49,3	2,8 ^a	7,8	0,4 ^b	9,9	0,7	1,6	0,2
DIETA 3 Ig, D1, Cht (1:1:2)	44,4	1,9 ^b	6,8	0,9 ^b	45,5	2,2 ^b	6,9	1,2 ^c	10	1,4	1,5	0,2

Las letras distintas indican diferencias significativas al 95% de confianza entre las dietas empleadas.

En cuanto a la longitud, se observaron diferencias significativas ($p<0,05$) entre las larvas premetamórficas entre la dieta 1 y la dieta 3 y también entre la dieta 2 y la dieta 3 (Fig. 6.8). La talla de las larvas postmetamórficas alimentadas con la dieta 3 fue inferior a la de las larvas alimentadas con la dieta 2 (Fig. 6.8).

El momento de la fijación de las larvas, desde que tuvo lugar el desove, se produjo entre los 22 (Dieta 3), 25 (Dieta 2) y los 28 días (Dieta 1: Fig. 6.8).

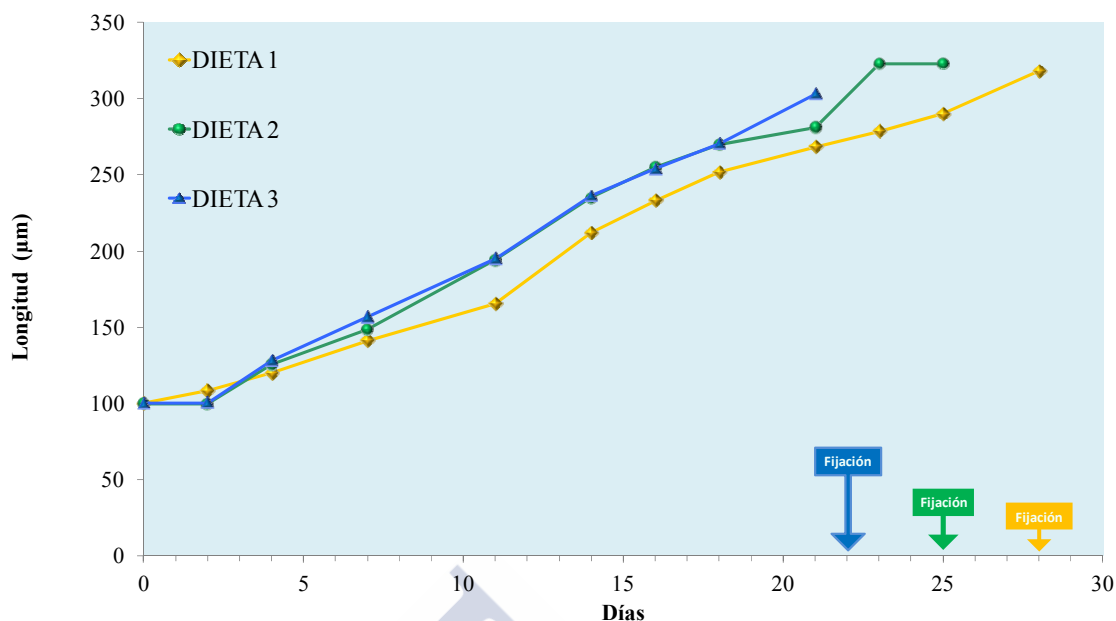


Figura 6.8. Evolución de los desarrollos larvarios en función de la dieta suministrada. Crecimiento en longitud (μm) y días de fijación.

El mejor desarrollo fue el de las larvas alimentadas con la dieta 3 constituida por las microalgas *I. galbana*, *D. lutheri* y *Chaetoceros sp.* en proporción (1:1:2), puesto que la fijación se alcanzó en menor tiempo (22 días) y la supervivencia con esta dieta fue la mejor. Se observaron diferencias significativas entre las tres supervivencias ($p < 0,05$), siendo la más alta (12%) en la dieta 3 frente a un 8% de la dieta 2 y un 1,5% en la dieta 1.

Se observaron diferencias significativas entre el contenido en proteínas en larvas premetamórficas alimentadas con la dieta 1 (247,4 ng/ind.) y la dieta 2 y 3 (313,6 y 313,8 ng/ind., respectivamente: Tabla VI.10). Las larvas postmetamórficas presentaron diferencias significativas en el contenido en proteínas entre las tres dietas estudiadas (Tabla VI.10). En cuanto al contenido en lípidos, se observaron diferencias significativas entre las larvas premetamórficas alimentadas con las dietas 1-2 y 2-3 (Tabla VI.10). Las larvas postmetamórficas, presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las alimentadas con cada una de las tres dietas. El contenido en carbohidratos de las larvas premetamórficas alimentadas con las tres dietas fue significativamente diferente (Tabla VI.10). Sin embargo, en las larvas postmetamórficas, se observaron diferencias con un intervalo de confianza del 95% entre las alimentadas con la dieta 1 y la dieta 3 y las alimentadas con la dieta 2 y la dieta 3 (Tabla VI.10).

Tabla VI.10. Composición bioquímica (ng/ind.) en larvas de 4 días, premetamórficas y postmetamórficas en función de la dieta suministrada.

		PROTEÍNAS		LÍPIDOS		CARBOHIDRATOS	
		ng/ind.	Desv.	ng/ind.	Desv.	ng/ind.	Desv.
Lv 4 Días		15,1	0,6	8,3	0,6	5,9	0,6
PREMETAMÓRFICA	D1	247,4	11,7 ^b	115,6	3,1 ^b	60,8	1,9 ^a
	D2	313,6	8,8 ^a	129,1	9,8 ^a	56,9	1,9 ^b
	D3	313,8	8,8 ^a	118,9	6,9 ^b	42,9	2,3 ^c
POSTMETAMÓRFICA	D1	43,8	13,6 ^c	42,5	0,7 ^c	27,9	5,2 ^a
	D2	72,9	8,2 ^b	64,3	2,9 ^b	13,1	0,9 ^b
	D3	322,9	18,1 ^a	108	1,5 ^a	19,5	5,6 ^b

Las letras distintas indican diferencias significativas al 95% de confianza entre las larvas pre- y postmetamórficas alimentadas con las diferentes dietas.

En porcentaje, se observaron diferencias significativas entre el contenido relativo en proteínas en larvas premetamórficas alimentadas con las dietas 1 y 2 y con las dietas 1 y 3. Las postmetamórficas alimentadas con las dietas 2 y 3 presentaron diferencias significativas (Fig. 6.9). En cuanto al contenido relativo en lípidos, no se observaron diferencias significativas entre las dietas en las larvas premetamórficas (Fig. 6.9). Sin embargo, en las postmetamórficas se observaron diferencias entre las alimentadas con las dietas 1 y 3 y entre las dietas 2 y 3 (Fig. 6.9). Por último, y para el contenido en carbohidratos, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en larvas premetamórficas y postmetamórficas alimentadas con las dietas 1 y 2 y las dietas 1 y 3 así como, entre las dietas 2 y 3 (Fig. 6.9).

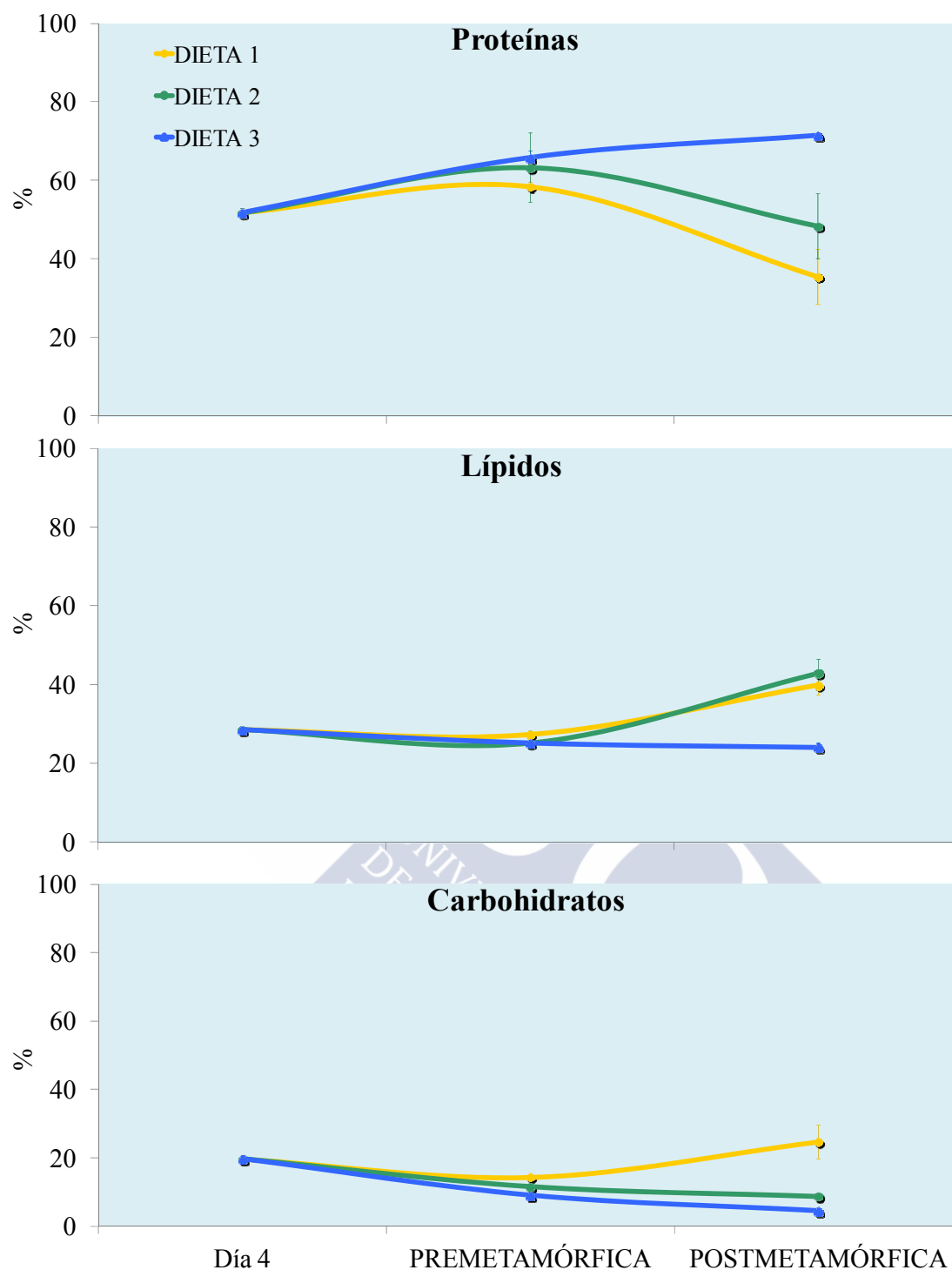


Figura 6.9. Evolución de carbohidratos, lípidos y proteínas en % de materia orgánica total, en los diferentes estadios, en función de la dieta suministrada.

El componente que más energía aportó en la dieta 1, fueron los lípidos (66,6%), le siguieron las proteínas (27,5%) y por último los carbohidratos (6%) (Tabla VI.11 y Figura 6.10). En las dietas 2 y 3, el mayor porcentaje de aporte energético también correspondió a los lípidos (65,8% y 62,2%, respectivamente), seguidos por las proteínas

(28,2% para la dieta 2 y 31% para la dieta 3) y por último los carbohidratos (5,9% y 6,8%, respectivamente).

Tabla VI.11. Contenido energético ($\mu\text{J ind.}^{-1}$) total y de las principales reservas (proteínas, lípidos y carbohidratos) de las dietas. Los equivalentes energéticos son $18,0 \text{ kJ g}^{-1}$ para las proteínas; $35,24 \text{ kJ g}^{-1}$ para lípidos y $17,16 \text{ kJ g}^{-1}$ para carbohidratos.

	PROTEÍNAS	LÍPIDOS	CARBOHIDRATOS	Total
D1	0,1388	0,3366	0,0302	0,5056
D2	0,1182	0,2761	0,0249	0,4193
D3	0,1215	0,2437	0,0265	0,3917

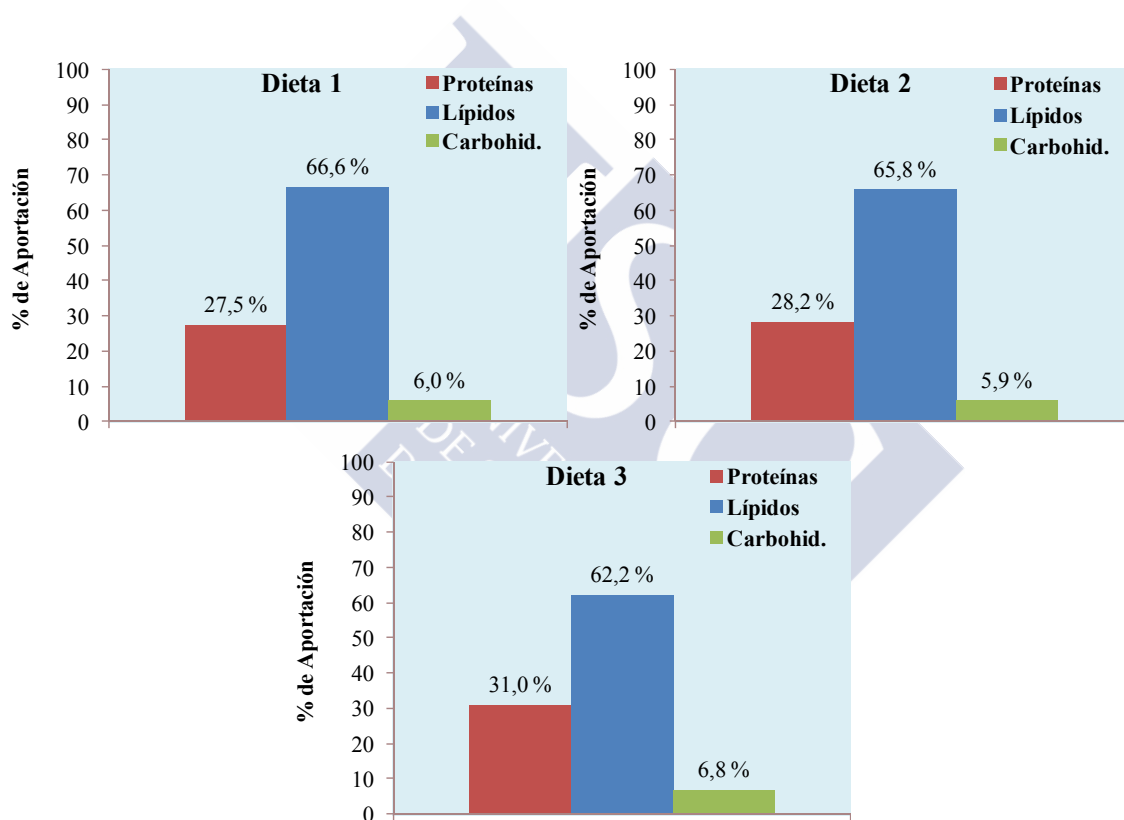


Figura 6.10. Porcentaje de aportación, en el contenido energético total ($\mu\text{J ind.}^{-1}$), de cada una de las principales reservas (proteínas, lípidos y carbohidratos) en las tres dietas estudiadas (D1, D2 y D3).

6. Bioquímica de los desarrollos larvarios

Las dietas 1 y 2 presentaron un aporte muy parecido de proteínas y de lípidos en la variación del contenido energético desde larvas de 4 días a postmetamórficas, pero en la dieta 3, fueron las proteínas las que aportaron más a dicha variación (Tabla VI.12 y Figura 6.11).

Tabla VI.12. Contenido energético (mJ indi.⁻¹) total y de las principales reservas (proteínas, lípidos y carbohidratos) y utilización de la energía (variaciones en mJ indi.⁻¹ y en %) durante las distintas fases de los tres desarrollos larvarios de *D. trunculus* sometidos a las tres dietas evaluadas (D1, D2 y D3). Los equivalentes energéticos son 18,0 kJ g⁻¹ para las proteínas; 35,24 kJ g⁻¹ para lípidos y 17,16 kJ g⁻¹ para carbohidratos.

		PROTEÍNAS		LÍPIDOS		CARBOHIDRATOS		Total	Variación del Total	
		mJ indi. ⁻¹	Variación	mJ indi. ⁻¹	Variación	mJ indi. ⁻¹	Variación	mJ indi. ⁻¹	mJ indi. ⁻¹	%
Lv. 4 Días		0,3		0,3		0,1		0,7		
PREMETAMÓRFICA	D1	4,5	4,2	4,1	3,8	1,0	0,9	9,6	8,9	1335,6
	D2	5,6	5,4	4,6	4,3	1,0	0,9	11,2	10,5	1576,1
	D3	5,6	5,4	4,2	3,9	0,7	0,6	10,6	9,9	1486,5
POSTMETAMÓRFICA	D1	0,8	-3,7	1,5	-2,6	0,5	-0,6	2,8	-6,8	-71,1
	D2	1,3	-4,3	2,3	-2,3	0,2	-0,8	3,8	-7,4	-66,0
	D3	5,8	0,2	3,8	-0,4	0,3	-0,4	10,0	-0,6	-5,895

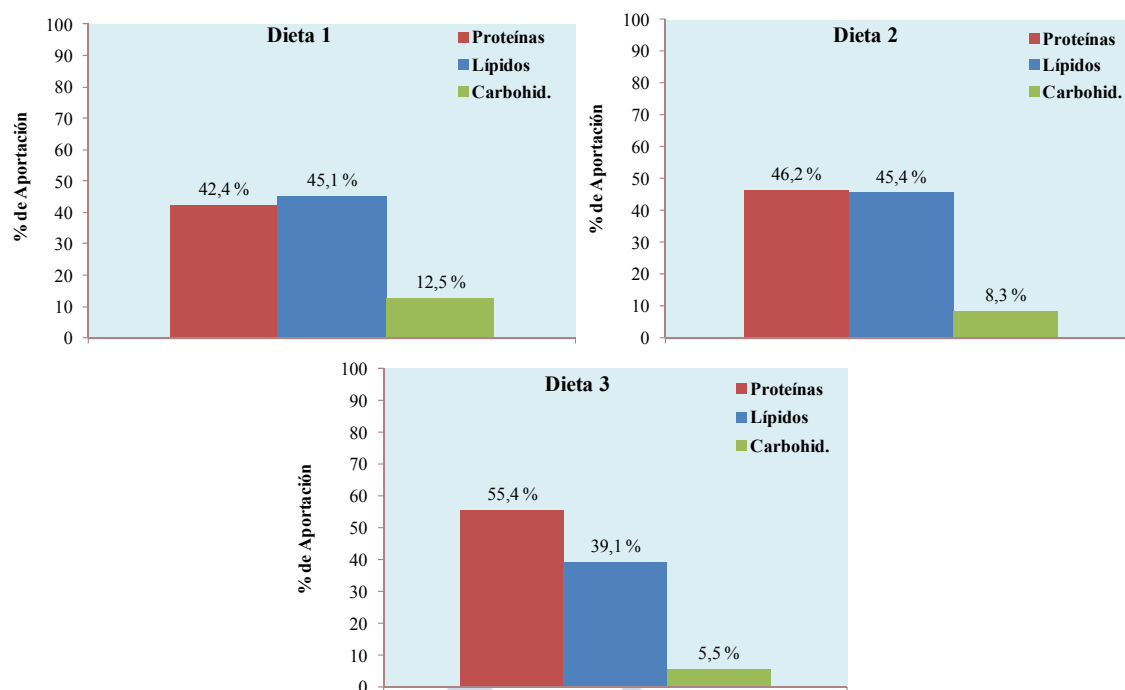


Figura 6.11. Porcentaje de aportación, en el contenido energético total (mJ indi.⁻¹), de cada una de las principales reservas (proteínas, lípidos y carbohidratos) desde el inicio de la prueba hasta larva postmetamórfica de *D. trunculus*, en las tres dietas estudiadas (D1, D2 y D3).

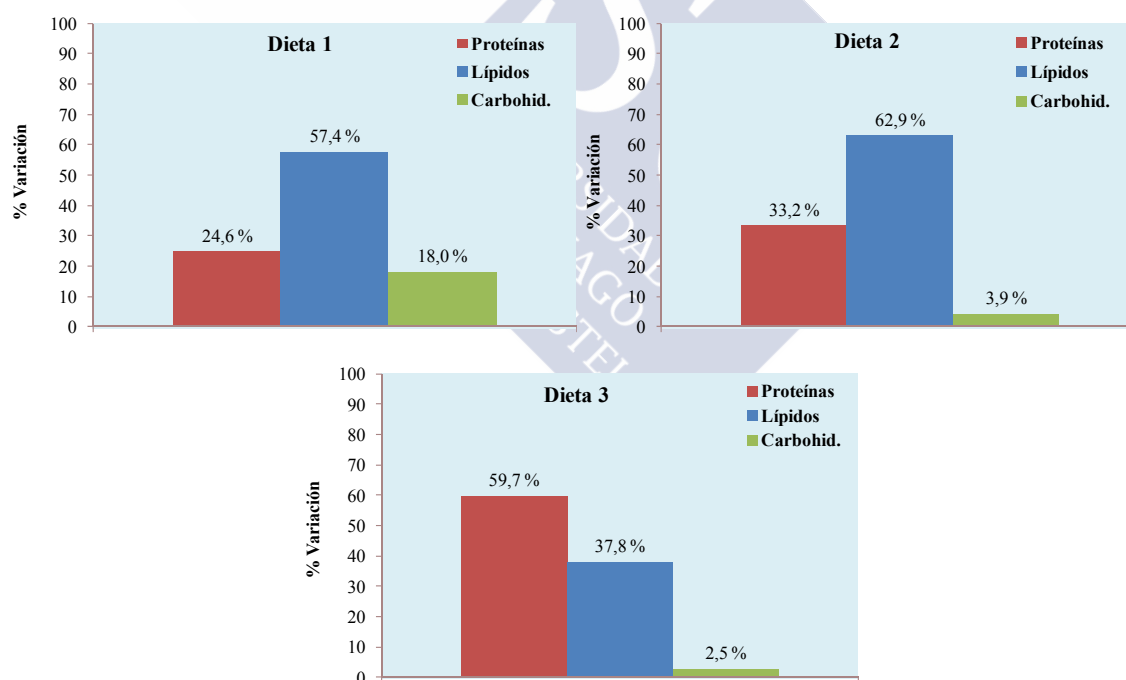


Figura 6.12. Variación, en porcentaje, del contenido energético de cada una de las principales reservas (proteínas, lípidos y carbohidratos) desde el inicio de la prueba hasta larva postmetamórfica de *D. trunculus*, en las tres dietas estudiadas (D1, D2 y D3).

El diferente comportamiento de los individuos alimentados con la dieta 3, desde el inicio al final del desarrollo larvario, también se observó en las variaciones

6. Bioquímica de los desarrollos larvarios

energéticas totales (Figura 6.12), dado que, en este caso fueron las proteínas las que sufrieron mayor variación (59,7%) y en los alimentados con las dietas 1 y 2 fueron los lípidos los que presentaron una mayor variación (57,4 y 62,9%, respectivamente).

Se observó una correlación negativa, con un intervalo de confianza del 95% entre el contenido en lípidos de las dietas y la supervivencia de fijación. El contenido en proteínas de los estadios de pre y postmetamórfica, presentó una correlación positiva con la supervivencia de fijación, con un intervalo de confianza del 99% (Tabla VI.13). Los lípidos en la larva postmetamórfica se relacionaron positivamente con la supervivencia en fijación. Sin embargo, el contenido de carbohidratos en las larvas pre y postmetamórficas presentó una correlación negativa con la supervivencia en fijación.

Tabla VI.13. Coeficiente de correlación de Pearson entre las composiciones bioquímicas de las dietas estudiadas (expresadas en porcentaje) y las larvas premetamórficas y postmetamórficas (ng/ind.), su tamaño (OL) y la supervivencia de fijación.

		DIETAS			PREMETAMÓRFICA			POSTMETAMÓRFICA		
		Prot.	Líp.	Carb.	Prot.	Líp.	Carb.	Prot.	Líp.	Carb.
PREMETAMÓRFICA	OL	0.077	0.04	-0.012	0.075	0.229	0.472*	-0.562*	-0.438	-0.184
	Prot.	-0.351	-0.716**	0.252	1	0.470	-0.650*	0.554	0.771**	-0.722**
	Líp.	-0.138	-0.607**	0.203	0.470	1	0.008	-0.231	0.024	-0.528*
	Carb.	-0.019	0.102	0.034	-0.650*	0.008	1	-0.976**	-0.956**	0.115
POSTMETAMÓRFICA	OL	0.215	0.250	0.310	-0.073	0.417	0.088	-0.102	-0.096	-0.339
	Prot.	0.184	0.133	-0.083	0.554	-0.231	-0.976**	1	0.963**	0.167
	Líp.	-0.136	-0.313	0.069	0.771**	0.024	-0.956**	0.963**	1	-0.290
	Carb.	0.139	0.926**	-0.512*	-0.722**	-0.528*	0.115	0.167	-0.290	1
Sup Fj.		-0.428	-0.613*	0.256	0.903**	0.238	-0.837**	0.755**	0.896**	-0.586*

OL: Longitud; Prot.: Proteínas; Líp.: Lípidos; Carb.: Carbohidratos; Sup Fj.: Supervivencia de fijación. **Negrita:** Correlación significativa; *: al 95% de confianza; **: al 99% de confianza; sin asteriscos: diferencias no significativas.

6.3.3. Pruebas de ayuno

Las larvas se mantuvieron en un régimen de ayuno a lo largo de siete días, momento en el que la mortalidad fue prácticamente del cien por cien. Su crecimiento en longitud (Figura 6.13) fue ligeramente ascendente durante los dos primeros días, pasando de una talla de ovocito de 85 μm hasta aproximadamente 103 μm en el día 2, manteniéndose las tallas prácticamente estables hasta el final de la experiencia (105 μm).

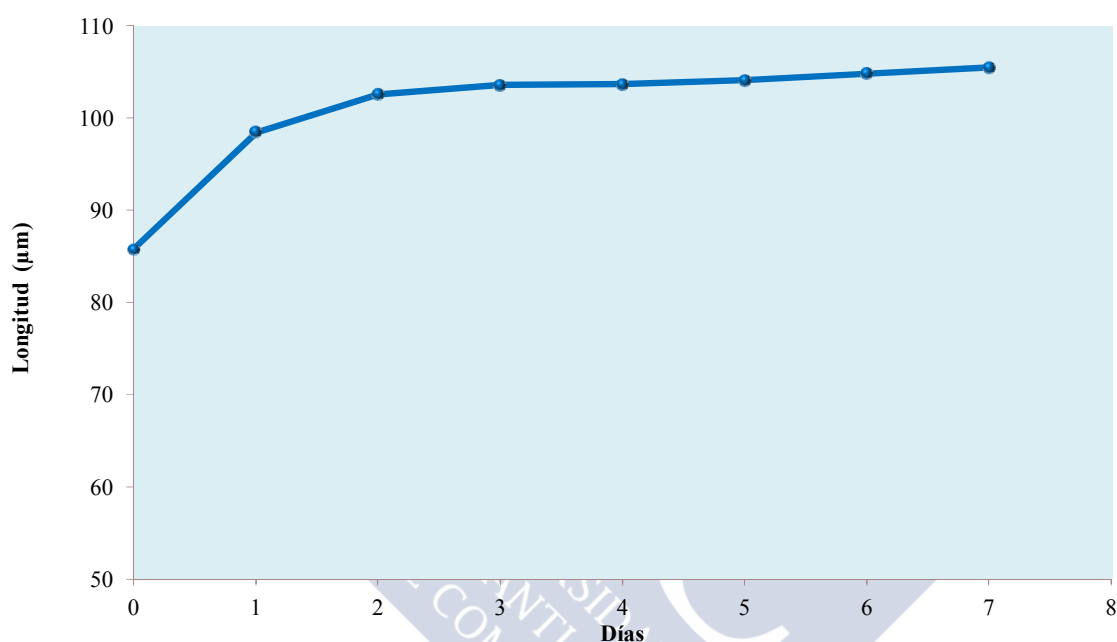


Figura 6.13. Crecimiento de las larvas a lo largo de los 7 días de ayuno.

En cuanto a la evolución en la composición bioquímica de las larvas, expresada en $\mu\text{g}/\text{ind.}$ (Figura 6.14), desde el inicio de la prueba, hasta su finalización, las proteínas presentaron una cierta estabilidad durante toda la experiencia. Los lípidos descendieron desde la etapa de ovocito (día 0) hasta el día 7, pero fueron los carbohidratos los que experimentaron un descenso más acusado.

6. Bioquímica de los desarrollos larvarios

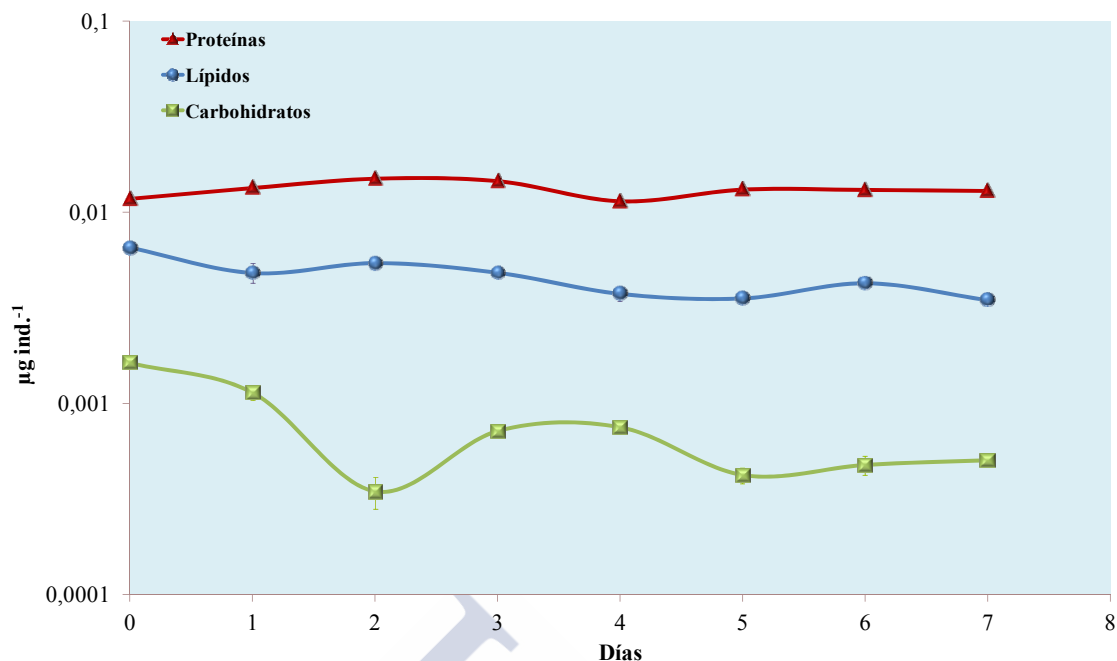


Figura 6.14. Evolución de la composición en carbohidratos, lípidos y proteínas, expresada en µg/ind., durante el ayuno.

Las proteínas representaron un 59,4% de la composición bioquímica en la etapa de ovocito (Figura 6.15). Su contenido aumentó en el día 2 (72,3%) y aumentó ligeramente al final de la experiencia (76,6). En los ovocitos, los lípidos representaban un 32,4%, valor que descendió hasta un 26,1% el día 2, llegando a 20,4% el último día de régimen de ayuno. El contenido en carbohidratos pasó de 8,2% en la fase de ovocito a 1,7% en el día 2 de cultivo, para terminar con un 3,0% el último día de cultivo.

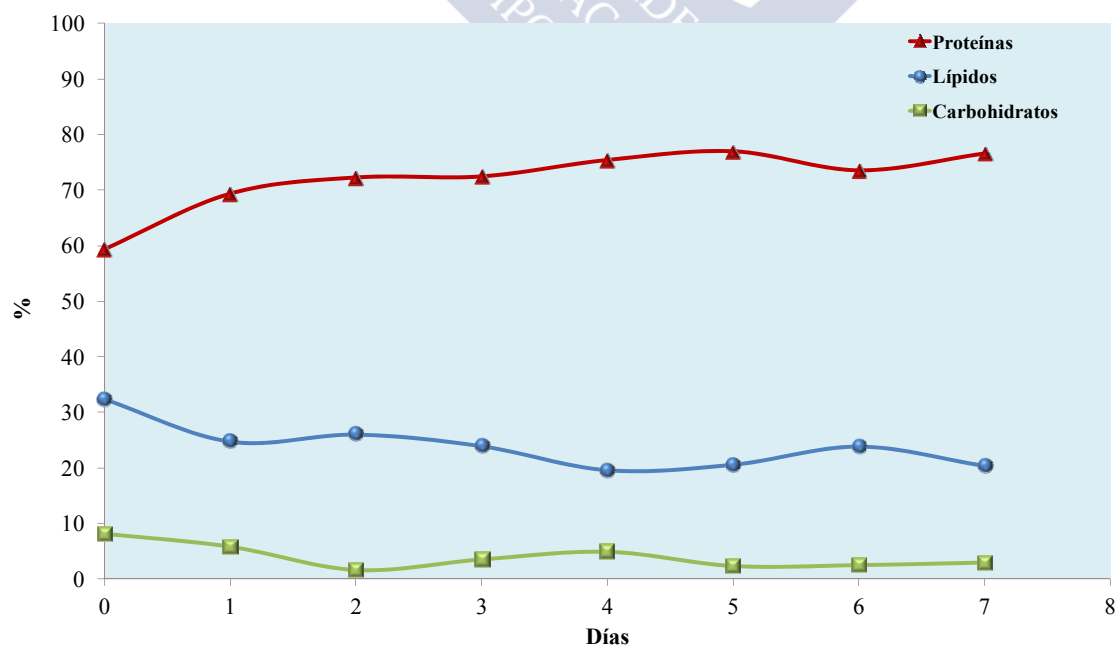


Figura 6.15. Evolución de la composición en carbohidratos, lípidos y proteínas, expresada en porcentaje de materia orgánica total, durante el régimen de ayuno.

El comportamiento de los tres componentes siguió un modelo de regresión lineal durante los 7 días de ayuno (Figura 6.16). En los carbohidratos y lípidos, la evolución fue descendente y los coeficientes de ajuste fueron de $R^2=0,77$ y $R^2=0,63$, respectivamente. Las proteínas aumentaron ligeramente (coeficiente de ajuste $R^2=0,63$).

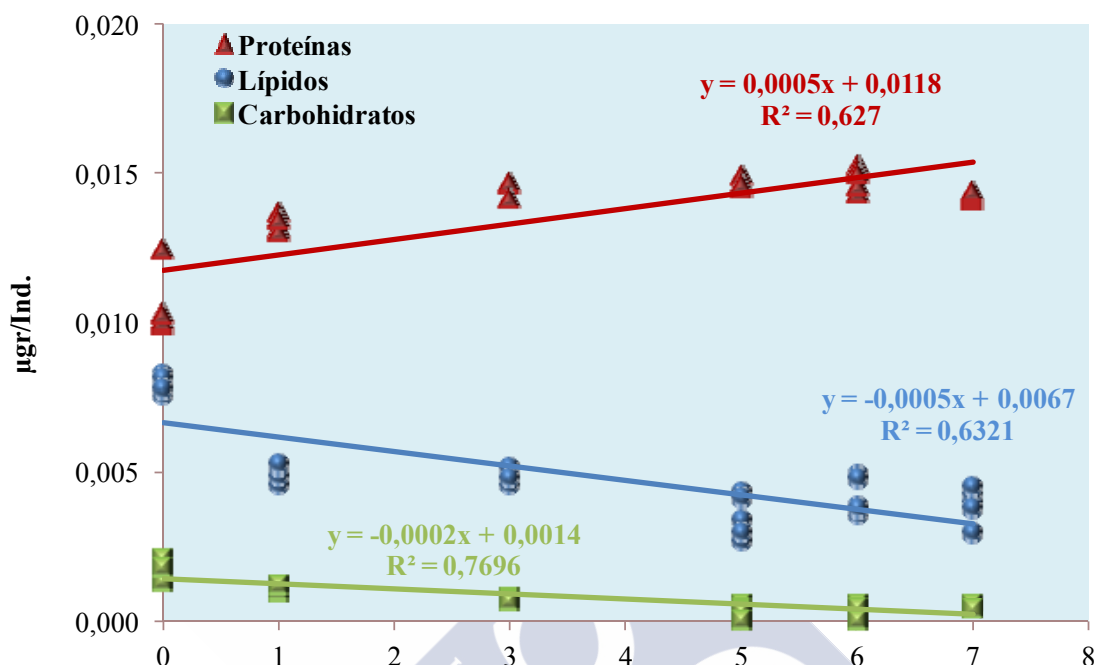


Figura 6.16. Evolución de carbohidratos, lípidos y proteínas durante el período de ayuno. Se representan las ecuaciones de regresión.

Los contenidos energéticos durante el ayuno y sus variaciones, se muestran y representan en la tabla VI.15 y figuras 6.19 y 6.20.

El componente que más energía aportó desde el inicio (día 0) hasta el final (día 7) de la prueba de ayuno, fueron las proteínas con un 57,7%, le siguieron los lípidos (39,2%) y los carbohidratos (3,1%: Tabla VI.14 y Figura 6.17). El porcentaje de variación, indica un consumo total de energía a medida que avanza la prueba (Figura 6.18). Este consumo fue más acusado en el caso de los lípidos (-101,9%) y en una medida mucho menor en los carbohidratos (-18,5%).

6. Bioquímica de los desarrollos larvarios

Tabla VI.14. Contenido energético (mJ indi.^{-1}) total y de las principales reservas (proteínas, lípidos y carbohidratos) y utilización de la energía (variaciones en mJ indi.^{-1} y en %) durante los 7 días en los que las larvas de *D. trunculus* fueron sometidas a ayuno. Los equivalentes energéticos son 18 para proteínas; 35,24 para lípidos y 17,16 para carbohidratos.

	PROTEÍNAS		LÍPIDOS		CARBOHIDRATOS		Total	Variación del Total	
	mJ indi.^{-1}	Variación	mJ indi.^{-1}	Variación	mJ indi.^{-1}	Variación	mJ indi.^{-1}	mJ indi.^{-1}	%
Día 0	0,2138		0,2310		0,0281		0,4729		
Día 1	0,2437	0,0299	0,1711	-0,0599	0,0195	-0,0085	0,4343	-0,0386	-8,15
Día 2	0,2727	0,0290	0,1925	0,0215	0,0059	-0,0136	0,4712	0,0368	8,48
Día 3	0,2645	-0,0082	0,1714	-0,0211	0,0123	0,0064	0,4483	-0,0228	-4,84
Día 4	0,2077	-0,0568	0,1335	-0,0380	0,0129	0,0005	0,3541	-0,0943	-21,02
Día 5	0,2390	0,0313	0,1266	-0,0069	0,0072	-0,0057	0,3729	0,0188	5,31
Día 6	0,2381	-0,0010	0,1515	0,0249	0,0082	0,0009	0,3978	0,0249	6,68
Día 7	0,2353	-0,0028	0,1237	-0,0278	0,0087	0,0005	0,3677	-0,0301	-7,57
TOTAL		0,0214		-0,1072		-0,0194		-0,1052	

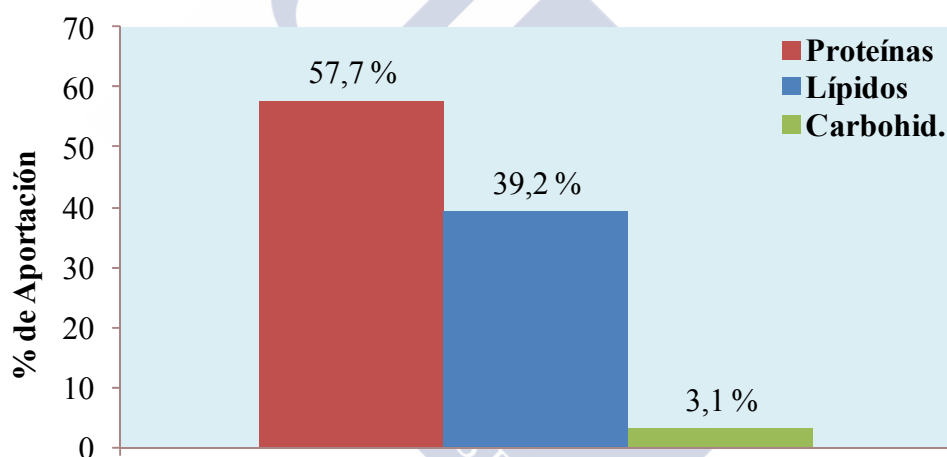


Figura 6.17. Porcentaje de aportación en el contenido energético total (mJ indi.^{-1}), de cada una de las principales reservas (proteínas, lípidos y carbohidratos) desde el inicio (Día 0) hasta el final (Día 7) de la prueba de ayuno a la que se sometieron las larvas de *D. trunculus*.

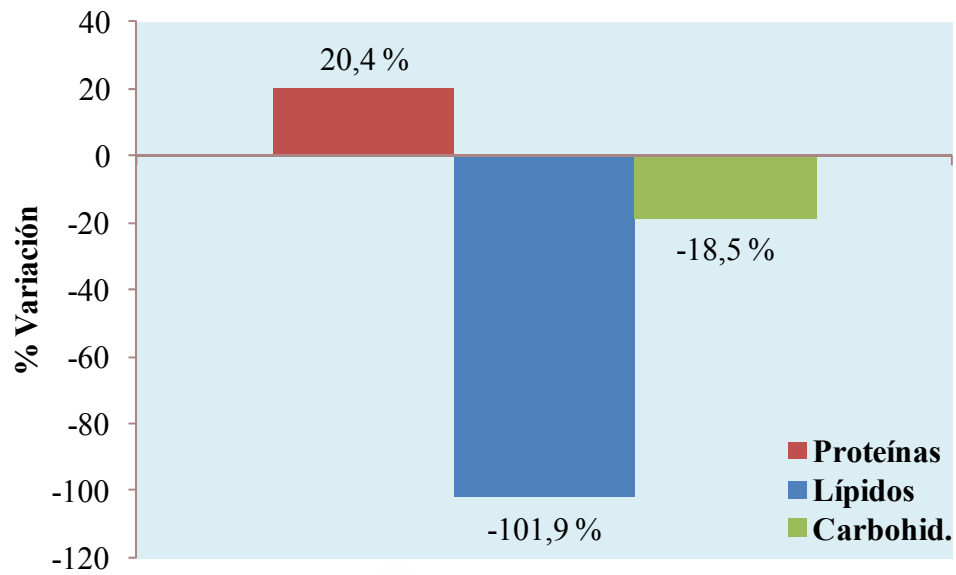


Figura 6.18. Variación en porcentaje del contenido energético de cada una de las principales reservas (proteínas, lípidos y carbohidratos) desde el inicio (Día 0) hasta el final (Día 7) de la prueba de ayuno, a la que se sometieron las larvas de *D. trunculus*.

6.4. DISCUSIÓN

La supervivencia y crecimiento en cultivos larvarios de bivalvos, se relaciona no solo con la capacidad de los individuos de asimilar alimento, sino también con el intercambio o consumo de sus componentes bioquímicos mayoritarios necesarios para avanzar de estadio.

La dieta mixta diaria suministrada a los 6 cultivos larvarios estudiados y constituida por las microalgas: *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, *Isochrysis aff. galbana* (T-iso), *Diacronema lutheri*, *Chaetoceros neogracile* y *Chaetoceros muelleri* se compuso de un 27,1% de proteínas, de un 14,5% de lípidos y un 5,3% de carbohidratos. Dado que la composición de la dieta puede repercutir en el éxito del cultivo, Brown *et al.* (1997) analizaron la composición bioquímica de 40 especies de microalgas, encontrando que las proteínas variaban entre el 6 y 52%, los lípidos entre el 7 y 23% y los carbohidratos entre el 5 y 23%. La composición de la dieta suministrada en este estudio se encuentra en los rangos de las especies analizadas, por lo que se puede considerar una dieta equilibrada.

El estudio de la composición bioquímica en carbohidratos, lípidos y proteínas, en porcentaje con respecto al peso seco total de ovocitos de *D. trunculus*, reveló que el componente principal, fueron las proteínas, con un porcentaje de un 26,1%, le siguieron los lípidos (8,1%) y el resto lo constituyen los carbohidratos (1,9%). La composición en proteínas en huevos de *Argopecten irradians concentricus* (Say, 1822) (64%) fue muy superior a la observada en el presente estudio (Lu *et al.*, 1999). Las tendencias son similares en: *Ensis arcuatus* donde las proteínas suponen un 33,2% respecto al peso seco total, los lípidos un 7,9% y los carbohidratos un 1,2% y *Ensis siliqua* con un 23,5% para las proteínas, 8,2% para los lípidos y 1,1% para los carbohidratos (da Costa, 2009); este mismo autor, describe también la composición en ovocitos de *Solen marginatus*, donde las proporciones son menores que en la coquina (13,5% de proteínas, 6,4% de lípidos y 0,6% de carbohidratos).

En ocasiones, el estudio de la composición bioquímica de ovocitos y demás estadios larvarios, expresando los datos en porcentaje relativo al peso seco, puede no ser

indicativo de la utilización de las reservas bioquímicas, por lo que el estudio se complementa añadiendo información acerca de la composición bioquímica en $\mu\text{g ind}^{-1}$. De esta forma, se observan mejor el almacenamiento y consumo de los diferentes sustratos energéticos, así como la evolución de los mismos.

La evolución de carbohidratos y lípidos, en $\mu\text{g ind}^{-1}$, desde ovocito hasta larva postmetamórfica es ascendente, pero en el caso de las proteínas, estas aumentan de ovocito a larva premetamórfica pero descienden de nuevo al pasar al estadio de larva postmetamórfica, mostrando un consumo de proteínas durante la metamorfosis. Las proteínas son la principal fuente de energía durante la metamorfosis en *Crassostrea gigas* (His y Maurer, 1988), *Ostrea edulis* (Rodríguez *et al.*, 1990) y *Mytilus galloprovincialis* (Sánchez-Lazo y Martínez-Pita, 2012). Sin embargo, otros autores citan los lípidos como el componente bioquímico principal utilizado durante la metamorfosis (Holland y Spencer, 1973; Ferreiro *et al.*, 1990). En *Argopecten irradians concentricus* los lípidos y las proteínas son utilizados durante la metamorfosis (Lu *et al.*, 1999). En *D. trunculus* las proteínas son el sustrato utilizado durante la metamorfosis.

Los contenidos energéticos de los distintos estadios estudiados y la variación existente entre ellos, ponen de manifiesto que en *D. trunculus*, el componente que más energía aporta son las proteínas, le siguen los lípidos, estando los carbohidratos en última posición. La estrategia bioquímica seguida en las especies *E. siliqua*, *E. arcuatus* (da Costa, 2009) y *S. marginatus* (da Costa *et al.*, 2011 b), destaca como fuente principal de energía las proteínas con diferencias entre las tres especies. Por el contrario, en *Mytilus galloprovincialis*, Sánchez-Lazo y Martínez Pita (2012), encuentran que son los lípidos los que constituyen una fracción bioquímica mayor en huevos y también consideran que son los lípidos la única fuente de energía invertida en el proceso de embriogénesis.

En el presente estudio se observó una correlación positiva, entre el contenido en carbohidratos y proteínas en el ovocito de *D. trunculus* y la supervivencia de fijación, lo cual parece sugerir que la cantidad de proteínas y carbohidratos presentes en el ovocito, son un factor que favorecerá la supervivencia en la fijación. El aumento del porcentaje de las proteínas en los ovocitos de *E. siliqua* también conduce a un aumento en la supervivencia en la fijación y en *E. arcuatus*, un mayor contenido de lípidos, proteínas y

carbohidratos en los ovocitos influye positivamente en la supervivencia a la hora de alcanzar la fijación (da Costa, 2009).

Varios estudios basados en la nutrición de bivalvos, ponen de manifiesto que la calidad de la dieta microalgal, tiene una influencia directa sobre el desarrollo y crecimiento de los mismos. Es el caso de *R. decussatus* (Matías *et al.*, 2011; Aranda-Burgos *et al.*, 2014a), *Crassostrea gigas* (Ponis *et al.*, 2006; Rico-Villa *et al.*, 2006; Ben Kheder *et al.*, 2010 a y b), *Venerupis pullastra* (Fernández-Reiriz *et al.*, 2009) y *Solen marginatus* (da Costa *et al.*, 2012a).

El mejor desarrollo fue el de los ejemplares alimentados con la dieta 3 constituida por las microalgas *Isochrysis galbana*, *Diacronema lutheri* y *Chaetoceros sp.* en proporción (1:1:2), en este caso la fijación se alcanzó en menor tiempo y la supervivencia fue la más alta. La dieta 1 compuesta por *I. galbana* y *D. lutheri*, fue la que presentó un menor crecimiento y supervivencia larvaria. La combinación de estas dos especies (*I. galbana* y *D. lutheri*) tiene un bajo valor nutricional para las larvas de *R. decussatus* (Aranda-Burgos *et al.*, 2014a). Además, las larvas de *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1791) alimentadas con *I. galbana* y *D. lutheri*, tuvieron un menor crecimiento y competencia que las dietas compuestas por *I. galbana* y *C. muelleri* (Pernet y Tremblay, 2004). También al alimentar las larvas de *C. gigas* con *I. galbana* y *D. lutheri* se obtuvo un bajo crecimiento y supervivencia, y las larvas no alcanzaron la competencia (Rico-Villa *et al.*, 2006). Estos autores observaron que al añadir *Chaetoceros calcitrans f. pumilus* Takano, además de estas dos especies de flagelados, el crecimiento y la supervivencia de las larvas fue elevado. Sin embargo, las larvas de la vieira *Pecten maximus* alimentadas con las dietas monoespecíficas *I. galbana* (clon T-Iso) o *D. lutheri* presentaron la fijación más elevada que las larvas alimentadas solo con *C. calcitrans*, las cuales presentaron el mayor crecimiento pero la menor fijación (Delaunay *et al.*, 1993). En general, la combinación de las especies *I. galbana* y *C. calcitrans*, proporciona buenos resultados en el cultivo de bivalvos (Marshall *et al.*, 2010).

En la experiencia de dietas realizada con *D. trunculus*, las mayores diferencias en composición bioquímica se encontraron entre las dietas 1 (constituida por *I. galbana* y *D. lutheri* en proporción (1:1)) y 3 (*I. galbana*, *D. lutheri* y *Chaetoceros sp.* (1:1:2)).

Se observó una correlación negativa entre la cantidad de lípidos en las dietas (en porcentaje) y la supervivencia en la fijación de *D. trunculus*. En las larvas de *R. decussatus* se citó también una correlación negativa entre el contenido relativo de lípidos en las dietas y el crecimiento de las larvas (Aranda-Burgos *et al.*, 2014a).

El análisis de la composición bioquímica de las larvas reveló una diferencia en el contenido en proteínas de las larvas premetamórficas alimentadas con la dieta 1 y las dietas 2 y 3. En el presente estudio, la dieta 3 (*I. galbana*, *D. lutheri* y *Chaetoceros sp.* (1:1:2)) presentó un porcentaje más elevado de proteínas que las otras dos dietas, siendo la dieta larvaria con la que obtuvo una mayor fijación. Sin embargo, el mayor aporte de proteínas (pg célula⁻¹) correspondió a la dieta 1 (*I. galbana* y *D. lutheri* (1:1)) y también la menor fijación. Aunque las proteínas de las microalgas son un componente bioquímico que raramente está relacionado con el rendimiento larvario, algunos estudios relacionan un alto aporte proteico de las dietas con mejores crecimientos y supervivencias larvarias, como en *C. gigas* y *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) (Uriarte *et al.*, 2004; Utting, 1986). En las larvas de *D. trunculus* se observó una correlación positiva entre el contenido de proteínas almacenado en las larvas pre y postmetamórficas (ng individuo⁻¹) y la supervivencia durante la fijación, mostrando la importancia de este compuesto bioquímico en esta fase larvaria, como anteriormente también se observó en el apartado 6.2.1, sobre el seguimiento de la evolución bioquímica de los desarrollos larvarios de esta especie.

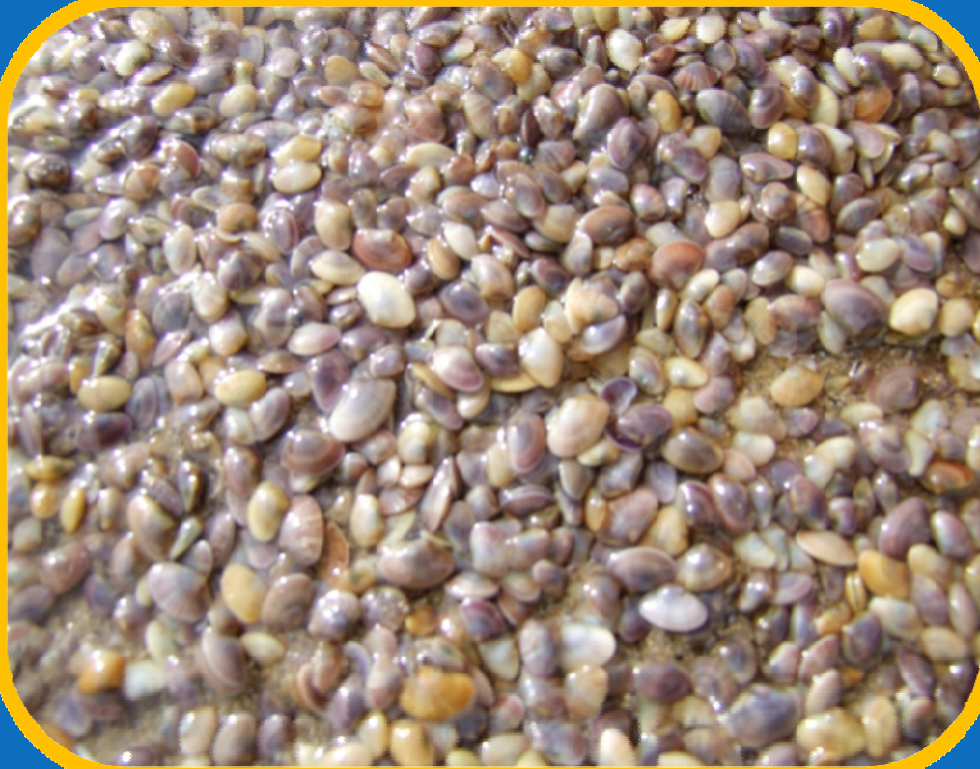
Existe cierta controversia en el uso de los carbohidratos durante el desarrollo larvario de los bivalvos. Algunos autores sugieren que los carbohidratos no tienen un papel importante en el desarrollo larvario (Gallager *et al.*, 1986; Holland y Spencer, 1973). Sin embargo, Whyte *et al.* (1989) mostraron que los carbohidratos de la dieta presentan importancia en el uso de proteínas y lípidos para la biosíntesis en las larvas frente al catabolismo para la producción de energía. En las larvas *C. gigas* y *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1857) las dietas ricas en carbohidratos aumentan el crecimiento de las larvas (Utting, 1986; Whyte *et al.*, 1989). Sin embargo, el contenido relativo de carbohidratos de las dietas (en %) presentó una correlación negativa con el crecimiento y supervivencia de las larvas de *R. decussatus* (Aranda-Burgos *et al.*, 2014a). En este estudio, no se observó relación alguna entre el contenido de carbohidratos de las dietas y la supervivencia en la fijación. Sin embargo, en las larvas

de *D. trunculus* se observó una correlación negativa entre el contenido de carbohidratos de las pre y postmetamórficas (ng individuo^{-1}) y la supervivencia en la fijación.

Las larvas de *D. trunculus* en ayuno solo sobrevivieron 7 días en este estudio. Sin embargo, otras especies como *C. gigas*, *Meretrix meretrix* (Linnaeus, 1758) y *R. decussatus* pueden sobrevivir largos períodos en ayuno (Moran y Manahan, 2004; Tang *et al.*, 2006; Matías *et al.*, 2011). Esto sugiere que las reservas en los ovocitos de *D. trunculus* no son muy elevadas para mantener las larvas sin alimento durante largos períodos de tiempo, con respecto a otras especies de bivalvos. Durante el ayuno, las larvas de *D. trunculus* utilizaron principalmente los lípidos como fuente de energía y en menor medida los carbohidratos. Las proteínas aumentaron ligeramente en las larvas de *D. trunculus*, sugiriendo la importancia de estos componentes en la estructura de las larvas. No ocurre lo mismo en otras especies como son las larvas de *R. decussatus* que durante el ayuno utilizan principalmente proteínas y lípidos, y una pequeña parte de la contribución energética corresponde a los carbohidratos (Matías *et al.*, 2011).



7. Conclusiones





7. CONCLUSIONES

1.-La población de *Donax trunculus* estudiada, presenta un ciclo anual de reproducción con un corto período de reposo (septiembre-noviembre) y un amplio período de madurez y puesta (marzo-julio).

2.-Macroscópicamente, a partir del estadio de gametogénesis avanzada o período en el que la gónada aparece ocupada en su mayor parte por tejido folicular, se pueden definir los sexos de la coquina, presentando las hembras la gónada de color violeta y los machos, de color blanco.

3.-La marcada estacionalidad a lo largo de la evolución del ciclo gametogénico, determina cambios en la composición bioquímica mayoritaria de los individuos. Los carbohidratos mantienen una relación inversa con el ciclo gametogénico, disminuyen conforme este avanza. A medida que los carbohidratos disminuyen, los lípidos aumentan, mientras que las proteínas mantienen un patrón de evolución estable y no relacionado con el ciclo.

4.-En el proceso de formación de la primera concha larvaria de *D. trunculus*, no se producirá una completa oclusión de la invaginación de la glándula de la concha para comenzar a secretar el periostraco. Este, terminará envolviendo el cuerpo del individuo formándose la larva D a las 41 horas post-fertilización.

5.-El pie en *D. trunculus*, aparece después de las dos semanas de cultivo, estando más del 50% de las larvas en estadio pediveliger entre los 20 y 22 días. Un mes después de la fertilización la coquina se transforma en postlarva, comenzando una vida estrictamente bentónica.

6.-El mantenimiento de los reproductores de *Donax trunculus* en criadero, para conseguir adelantar un mes su madurez de reproducción con respecto al medio natural, es posible con temperaturas de agua de 17°C. A esta temperatura se obtienen desoves en el mes de febrero y se asegura la supervivencia de los progenitores.

7.-Se consiguen puestas con progenitores de coquina que llegan al criadero procedentes del medio natural, durante el período de madurez, simplemente al introducirlos en tanques con agua a una temperatura de 16°C después de permanecer, durante su traslado, 24 horas en nevera.

8.-Para conseguir desoves, el método de inducción que resultó más eficaz en *D. trunculus*, fue el mantenimiento de reproductores en seco a temperatura ambiente ($14^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$) durante aproximadamente 10 horas para su posterior introducción en agua de mar a una temperatura en torno a los 18°C.

9.-El cultivo larvario de coquina realizado con una temperatura de agua de $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ y una dieta mixta a base de diatomeas y flagelados cultivados en sistema cultivo continuo, tiene una duración aproximada de un mes. Su crecimiento se corresponde a un modelo lineal de 5,49 $\mu\text{m}/\text{día}$ y los cambios morfológicos más significativos, transcurren entre los 20 y 25 días, momento en que aparece el pie.

10.-Para alcanzar el estadio de postlarva y comenzar su vida bentónica, los individuos necesitan un sustrato, por lo tanto en *D. trunculus*, es importante incorporar un fino sustrato de arena que le permitirá completar con éxito las fases finales de su transformación.

11.-El cultivo postlarvario en la coquina, partiendo de tallas superiores a 350 μm hasta semilla de 3 mm, dura aproximadamente 3 meses. Durante esta etapa, el crecimiento en longitud de la especie se ajusta a un modelo lineal con un crecimiento diario de 0,04 mm/día.

12.-El preengorde de la coquina en el medio natural, presentó un patrón de crecimiento bajo en los meses de invierno, mientras que un preengorde en los meses de primavera-verano, con temperaturas más elevadas y mayor disponibilidad de fitoplancton en la columna de agua, han favorecido el crecimiento y supervivencia de la semilla.

13.-De las estructuras ensayadas para el preengorde en la coquina, la que mejor funcionó fueron los cubos de polietileno con sistema de flujo forzado de aire.

14.-Las tallas iniciales son un factor determinante en el preengorde de la coquina puesto que influyen en su supervivencia. La semilla preengordada que partió de una talla superior a 3 mm presentó una mayor supervivencia.

15.-Analizando todos los datos obtenidos del cultivo de esta especie se pudo pronunciar la hipótesis de que, para el cultivo integral de *D. trunculus* en condiciones óptimas en criadero y con las condiciones en el medio natural favorables, desde la obtención del desove en criadero hasta alcanzar los 35 mm (talla comercial), serían necesarios unos 19 meses aproximadamente.

16.-Con todos los resultados obtenidos en las distintas fases, se puede afirmar que existe la posibilidad de obtener semilla de *D. trunculus* en criadero y sembrarla en el medio natural para llegar a su talla comercial.

17.-El componente mayoritario en todos los estadios del desarrollo larvario fueron las proteínas, que es el que aporta más energía desde ovocito a postlarva y por lo tanto, son el sustrato utilizado por *D. trunculus* durante su metamorfosis. Los lípidos serán el segundo componente en importancia tanto en contenido como en su implicación energética y los carbohidratos, presentaron una menor proporción y suponen un menor aporte energético.

18.-Se observó una correlación positiva, entre el contenido en carbohidratos y proteínas del ovocito de *D. trunculus* y la supervivencia en la fase de fijación, lo cual indica que la cantidad de proteínas y carbohidratos presentes en el ovocito son un factor que favorecerá la supervivencia en la fijación.

19.-Una dieta compuesta de una mezcla de microalgas como son *I. galbana*, *P. lutheri* y *Chaetoceros sp.* en la proporción 1:1:2, presentó un porcentaje más elevado de proteínas que otras dietas en las que la cantidad de *Chaetoceros sp.* fue nula o más baja. Esta dieta, basada en un mayor aporte de esta diatomea, obtuvo una mayor fijación de las larvas de coquina y en el menor tiempo.

20.-En las larvas de *D. trunculus* se observó una correlación positiva entre el contenido de proteínas almacenado en las larvas premetamórficas (ng individuo⁻¹) y la

supervivencia en la fase de fijación. Y se observó una correlación negativa, entre el contenido en lípidos de las dietas y la supervivencia de fijación.

21.-El mantenimiento en ayuno a las larvas de la coquina a lo largo de siete días, no influye en su contenido proteico pero, la cantidad de lípidos descendió siendo la principal fuente de energía y los carbohidratos fueron el componente que sufrió un descenso más acusado, con una menor contribución energética que los lípidos.



8. Bibliografía





8. BIBLIOGRAFÍA

- ACKMAN, R.G. 1989. Fatty acids. En: Ackman, R.G (ed). *Marine biogenic lipids, fats and oils*. CRC Press, Florida. 1: 103-138.
- ADACHI, K. 1979. Seasonal changes of the protein level in the adductor muscle of the clam, *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) with reference to the reproductive seasons. *Comparative Biochemistry Physiology* 64A: 85-89.
- ALBENTOSA, M.; PÉREZ-CAMACHO, A.; LABARTA, U.; BEIRAS, R. y FERNÁNDEZ-REIRIZ, M.J. 1993. Nutritional value of algal diets to clam spat *Venerupis pullastra*. *Marine Ecology Progress Series* 97 (3): 261-269.
- ALBENTOSA, M.; LABARTA, U.; FERNÁNDEZ-REIRIZ, M.J. y PÉREZ-CAMACHO, A. 1996. Fatty acid composition of *Ruditapes decussatus* spat fed on different microalgae diets. *Comparative Biochemistry Physiology*, 113 (A): 113- 119.
- ALLEN, J.A. 1961. The development of *Pandora inequivalvis* (Linné). *Journal of Embriology and Experimental Morphology* 9: 252-268.
- ANDRÉ, C.; LINDERGARTH, M.; JONSSON, P.R. y SUNDBERG, P. 1999. Species identification of bivalve larvae using random amplified polymorphic DNA (RAPD): differentiation between *Cerastoderma edule* and *C. lamarcki*. *Journal of the Marine Association of the UK*. 79: 563-565.
- ANGER, K.; HARMS, J.; PUSCHEL, C. y SEEGER, B. 1989. Physiological and biochemical changes during the larval development of a brachyuran crab reared under constant conditions in the laboratory. *Helgolander Meeresuntersuchungen* 43: 224-244.
- ANSELL, A.D. 1962. The functional morphology of the larva, and the post-larval development of *Venus striatula* (Da Costa). *Journal of the Marine Association* 42 (2): 419-443.

- ANSELL, A.D. 1972. Distribution, growth and seasonal changes in biochemical composition for the bivalve *Donax vittatus* (Da Costa) from Kames Bay, Millport. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 108(2): 137-150.
- ANSELL, A.D. 1983. The biology of the genus *Donax*. En: A. McLachlan & T. Erasmus (Eds). *Sandy beaches as Ecosystems*. The Hague, Dr. W. Junk Publishers VIII: 607-628.
- ANSELL, A.D.; LOOSMORE, F.A. y LANDER, K.F. 1964. Studies on the hard-shell clam, *Venus mercenaria*, in the British waters. Vol II. Seasonal cycle in condition and biochemical composition. *Journal of Applied Ecology*. 1: 83-95.
- ANSELL, A.D. y BODOY, A. 1979. Comparison of events in the seasonal cycle for *Donax vittatus* and *Donax trunculus* in european waters. En Cycle phenomena in marine plants and animals. Proc. 13th europ. *Marine Biology Symposium* Ed. E. Naylor and R. G. Hartnoll. Pergamon Press Oxford and New York. 191-198.
- ANSELL, A.D. y LAGARDÈRE, F. 1980. Observations on the biology of *Donax trunculus* and *D. vittatus* at Ile d'Oléron (French Atlantic Coast). *Marine Biology* 57: 287-300.
- ANSELL, A.D.; FRENKIEL, L. y MOUËZA, M. 1980. Seasonal changes in tissue weight and biochemical composition for the bivalve *Donax trunculus* L. on the Algerian coast. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 45: 105-116.
- ARANDA, J.A.; LOUZÁN, A.; DA COSTA, F.; CERVIÑO-OTERO, A.; NÓVOA, S.; OJEA, J. y MARTÍNEZ-PATIÑO, D. 2009. Desarrollo embrionario y larvario de dos especies de moluscos bivalvos: *Donax trunculus* (Linné, 1758) y *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758). *XII Congreso Nacional de Acuicultura*. 516-517.
- ARANDA, J.A.; OJEA, J.; NÓVOA, S. y MARTÍNEZ-PATIÑO, D. 2010. Primeros datos de la calidad de las puestas, en relación al estado de los reproductores de

- dos especies de almejas: *Ruditapes decussatus* y *Ruditapes philippinarum*. XII *Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas*. 12: 617-624.
- ARANDA-BURGOS, J.A. 2010. Desarrollo embrionario y larvario de almeja fina, *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758): estudio al microscopio óptico y electrónico de barrido. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Santiago de Compostela.
- ARANDA-BURGOS, JA.; DA COSTA, F.; NOVOA, S.; OJEA, J.; MARTINEZ-PATINO, D. 2014a. Effects of microalgal diet on growth, survival, biochemical and fatty acid composition of *Ruditapes decussatus* larvae. *Aquaculture*, 420: 38-48
- ARANDA-BURGOS, JA.; DA COSTA, F.; NOVOA, S.; OJEA, J.; MARTINEZ-PATINO, D. 2014b. Embryonic and larval development of *Ruditapes decussatus* (Bivalvia: Veneridae): a study of the shell differentiation process. *Journal of Molluscan Studies*, 80: 8-16.
- B**ADINO, G. y MARCHIONNI, V. 1972. Neurosecretion and gonad maturation in a population of *Donax trunculus* L. from Leghorn (Italy). *Bollettino di Zoologia* 39: 321-326.
- BARBER, B.J. y BLAKE, N.B. 1991. Reproductive Physiology. En: *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture, Developments in Aquaculture and Fisheries Science*. Elsevier, Amsterdam. 21: 377-428.
- BAYED, A. y GUILLOU, J. 1985. Contribution à l'étude des populations du genre *Donax* : la population de *D. trunculus* L. (Mollusca, Bivalvia) de Mehdiya (Maroc). *Annales de L'Institut Océanographique*., Paris 61 (2), 139-147.
- BAYED, A. 1990. Reproduction de *Donax trunculus* sur la côte Atlantique marocaine. *Cahiers de Biologie Marine*. 31(2): 159-169.
- BAYNE, B.L. y NEWELL, R.C. 1983. Physiological energetic of marine molluscs. En: Saleudin, A.S.M. & Wilbur, K.M. (ed). *The Mollusca*:. 4: 407-415.

- BAYNE, B.L. 1965. Growth and delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis* (L). *Ophelia*. 2: 1-47.
- BEN KHEDER, R.; QUÉRÉ, C.; MOAL, J. y ROBERT, R. 2010. Effect of nutrition on *Crassostrea gigas* larval development and the evolution of physiological indices. Part A: Quantitative and qualitative diet effects. *Aquaculture*. 305: 165-173.
- BEN KHEDER, R.; QUÉRÉ, C.; MOAL, J. y ROBERT, R. 2010. Effect of nutrition on *Crassostrea gigas* larval development and the evolution of physiological indices. Part B: Effects of temporary food deprivation. *Aquaculture*. 308: 174-182.
- BENINGER, P.G. y LUCAS, A. 1984. Seasonal variations in condition, reproductive activity, and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common habitat: *Ruditapes decussatus* L. (Jeffreys) and *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 79: 19-37.
- BENSADOUN, A. y WEINSTEIN, D. 1976. Assay of proteins in the presence of interfering material. *Analytical Biochemistry*. 70: 241-250.
- BERNTSSON, K.M.; JONSSON, P.R.; WÄNGBERG, S.A. y CARLSSON, A.S. 1997. Effects of broodstock diets on fatty acid composition, survival and growth rates in larvae of the european flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture* 154 (2): 139-153.
- BESNARD, J.Y.; LUBET, P. y NOUVELOT, A. 1989. Seasonal variations of the fatty acid contents of the neutral lipids and phospholipids in the female gonad of *Pecten maximus* L. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 93B(1): 21-26.
- BEUKEMA, J.J. 1974. Seasonal changes in the biomass of the macro-benthos of a tidal flat area in the Dutch Wadden Sea. *Neth. Journal of Sea Research*. 8: 94-107.
- BEUKEMA, J.J. y DE BRUIN, W. 1979. Calorific values of the soft parts of the tellinid bivalve *Macoma balthica* (L.) as determined by two methods *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. Vol 37. Issue: 1: 19-30.

- BODOY, A. y MASSÉ, H. 1979. Quelques paramètres permettant de suivre la production organique d'un mollusque bivalve au cours d'un cycle saisonnier. Publ. Sci. Tech, CNEXO : *Actes de Colloques*. 7: 753-766.
- BODOY, A. 1982. Croissance du bivalve *Donax trunculus* L. en Méditerranée Nord-Occidentale (France). *Malacologia*, 22: 353-358.
- BOUSSOUFA, D.; GHAZALI, N.; VICIANO, E.; NAVARRO, J.C. y EL CAFSI, M. 2011. Seasonal variation in condition and fatty acid composition of coquina clam, *Donax trunculus* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia) from the Tunisian coast. *Cahiers de Biologie Marine*. 52: 47-56.
- BOZZO, M.G.; POQUET, M.; SAGRISTÀ, E. y DURFORT, M. 2008. Ultraestructura dels espermatozoides de *Crassostrea gigas*, *Mytilus galloprovincialis* i *Donax trunculus* (Mollusca: Bivalvia). *Biologia de la reproducció*. Vol. 59: 59-70.
- BROWN, M.R.; JEFFREY, S.W.; VOLKMAN, J.K. y DUNSTAN, G.A. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*. 151: 315-331.
- BUCQUOY, E.; DAUTZENBERG, P. y DOLLFUS, G. 1898. Les mollusques marins du Roussillon. *II Pélécypodes. Avec Atlas de 99 planches en Phototypie.*, J. B. Bailliére and Fils, Paris. Tomo 2.
- CAERS, M.; COUTTEAU, P. y SORGELOOS, P. 1999. Dietary impact of algal and artificial diets, fed at different rations, on the growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* (L.) spat. *Aquaculture*. 170: 307-322.
- CARRIKER, M.R. y PALMER, R.E. 1979. Ultrastructural morphogenesis of prodissoconch and early dissoconch valves of the oyster *Crassostrea virginica*. *Proceedings of the National Shellfisheries Association*. 29: 103-128.
- CARSTENSEN, D.; LAUDIEN, J.; SIELFELD, W.; OLIVA, M.E. y ARNTZ, W. 2010. Early larval development of *Donax obesulus*: response to El Niño

- temperature and salinity conditions. *Journal of Shellfish Research*. 29(2): 361-368.
- CASSE, N.; DEVAUCHELLE, N. y LE PENNEC, M. 1998. Embryonic shell formation in the Scallop *Pecten maximus* (Linnaeus). *The Veliger*. 41: 133-141.
- CERVIÑO-OTERO, A. 2005. Estudio del ciclo reproductivo de la almeja babosa *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803), en dos poblaciones de la costa gallega: Camariñas y O Grove. Diploma de Estudios Avanzados. Universidad de Santiago de Compostela. 64 pp.
- CERVIÑO-OTERO, A. 2011. Ciclo reproductivo, cultivo en criadero y en el medio natural de la almeja babosa *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803). Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. 288 pp.
- CERVIÑO-OTERO, A.; DA COSTA, F.; OJEA, J.; NÓVOA, S. y MARTÍNEZ-PATÍÑO D. 2008. Embryonic, larval and post-larval development in the pullet carpet shell, *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803). *Aquaculture Europe*: 133-134.
- CERVIÑO-OTERO, A.; DA COSTA, F.; OJEA, J.; NÓVOA, S. y MARTÍNEZ-PATÍÑO D. 2009. Desarrollo embrionario y larvario de tres especies de bivalvos: navaja (*Ensis arcuatus*), longueirón (*Ensis siliqua*) y almeja babosa (*Venerupis pullastra*). En: *XI Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas*. 317-320.
- CHANLEY, P. 1969. Larval development of the coquina clam, *Donax variabilis* Say, 1822 with a discussion of the structure of the larval hinge in the Tellinacea. *Bulletin of Marine Science*. 19(1): 214-224.
- CRANFIELD, H.J. 1973. A study of the morphology, ultrastructure, and histochemistry of the foot of the pediveliger of *Ostrea edulis*. *Marine Biology*. 22: 187-202.
- CRISP, D.J. 1974. Energy relations of marine invertebrate larvae. *Thalassia Jugoslavica* 10: 103-120.

- DA COSTA, F.; DARRIBA, S. y MARTÍNEZ-PATIÑO, D. 2008. Embryonic and larval development of *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865) (Bivalvia: Pharidae). *Journal of Molluscan Studies*. 74: 103-109.
- DA COSTA, F. 2009. Optimización del cultivo en criadero de navaja (*Ensis arcuatus* Jeffreys, 1865), longueirón (*E. siliqua* Linneo, 1758) y longueirón vello (*Solen marginatus* Pennánt, 1777): composición bioquímica y de ácidos grasos en los desarrollos larvarios. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. 336 pp.
- DA COSTA, F y MARTÍNEZ-PATIÑO, D. 2009. Culture potential of the razor clam *Solen marginatus* (Pennánt, 1777). *Aquaculture* 288: 57-64.
- DA COSTA, F.; DARRIBA, S.; MARTÍNEZ-PATIÑO, D. y GUERRA, A. 2010a. Culture possibilities of the razor clam *Ensis arcuatus* (Pharidae: Bivalvia). *Aquaculture Research*: 1-9.
- DA COSTA, F.; MARTÍNEZ-PATIÑO, D.; OJEA, J y NÓVOA, S. 2010b. Larval rearing and spat production of the razor clam *Ensis siliqua* (Bivalvia: Pharidae). *Journal of Shellfish Research* 29, 347-351.
- DA COSTA, F.; ARANDA-BURGOS, J.A.; CERVIÑO-OTERO, A.; NÓVOA-VÁZQUEZ, S.; OJEA, J. y MARTÍNEZ-PATIÑO, D. 2011a. Desarrollo embrionario de *Ensis siliqua* con microscopía electrónica de barrido y transmisión: Estudio de la formación de la concha. En: *Congreso Nacional de Acuicultura XIII*.
- DA COSTA, F.; NÓVOA, S.; OJEA, J. y MARTÍNEZ-PATIÑO, D. 2011b. Changes in biochemical and fatty acid composition of the razor clam *Solen marginatus* (Solenidae: Bivalvia) during larval development. *Marine Biology*. 158(8): 1829-1840.
- DA COSTA, F.; NÓVOA, S.; OJEA, J. y MARTÍNEZ-PATIÑO, D. 2012a. Effects of algal diets and starvation on growth, survival and fatty acid composition of *Solen marginatus* (Bivalvia: Solenidae) larvae. *Scientia Marina*. 76(3): 527-537.

- DA COSTA, F.; ARANDA-BURGOS, J.A.; CERVIÑO-OTERO, A.; FERNÁNDEZ-PARDO, A.; LOUZÁN, A.; NÓVOA, S.; OJEA, J. & MARTÍNEZ-PATÍÑO, D. 2012b. Clam hatchery and nursery culture. *Clam fisheries and aquaculture*. Clave: A. ISBN: 978-1-6-62257-587-3. Editor: da Costa González, F.
- DARRIBA, S. 2001. Biología de la navaja (*Ensis arcuatus* Jeffreys, 1865) de la Ría de Vigo (N.O. de España): Crecimiento y reproducción. Tesis doctoral. Universidad de Vigo. 283 pp.
- DARRIBA S.; MARTÍNEZ, D. y GUERRA, A. 2002. The razor clam *Ensis arcuatus*: perspectives for hatchery outgrowing culture. *Abstracts Aquaculture Europe*. Special publication nº 32. 198-199.
- DE SANTIAGO, J.A.; ANDRÉS, M.C.; GUERRA, A. 2007. Preengorde de almeja babosa *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803), mediante un sistema de flujo invertido por “air-lift”, en la Ría de Camariñas (A Coruña). *XI Congreso Nacional de Acuicultura*. Tomo I: 423-426.
- DE SANTIAGO, J.A.; FERNÁNDEZ, A.; RUÍZ, M. y GUERRA, A. 2008. Preengorde de almeja babosa (*Venerupis pullastra* Montagu, 1803), almeja fina (*Ruditapes decussatus* Linné, 1758) y almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum* Adams & Reeve, 1850) en tres sistemas de preengorde. *X Foro dos recursos mariños e da acuicultura das rías galegas e I foro iberoamericano dos recursos mariños e da acuicultura*. 381-387.
- DE SANTIAGO, J.A.; GRAÑA, L.; LAMPÓN, V.; POMAL, M.; POUSO, M. y GUERRA, A. 2010. Rendimiento de un sistema de preengorde para semilla de almeja, en flujo de agua invertido y forzado por *air lift*, en pantalán del recinto portuario de Camariñas (A Coruña). *XII Foro dos recursos mariños e da acuicultura das rías galegas e I foro iberoamericano dos recursos mariños e da acuicultura*. 12: 641-647.
- DELAUNAY, F. 1992. Nutrition lipidique de la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* (L.) au cours du developpement larvaire. Thèse de doctoral. Université de Brest. 192 pp.

- DELAUNAY, F.; MARTY, Y.; MOAL, J. y SAMAIN, J.F. 1993. The effect of monospecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 173: 163-179.
- DELGADO, M. y PÉREZ-CAMACHO, A. 2007. Comparative study of gonadal development of *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve) and *R. decussatus* (L.) (Mollusca: Bivalvia): Influence of temperature. *Scientia Marina* 71(3): 471-484.
- DEVAL, M.C. 2009. Growth and reproduction of the wedge clam (*Donax trunculus*) in the Sea of Marmara, Turkey. *Journal of Applied Ichthyology*, 25: 551–558.
- DOROUDI, M.S. y SOUTHGATE, P.C. 2000. The influence of algal ration and larval density on growth and survival of blacklip pearl oyster *Pinctada margaritifera* (L.) larvae. *Aquaculture Res.* 31: 621-626.
- DOROUDI, M.S y SOUTHGATE, P.C. 2003. Embryonic and larval development of *Pinctada margaritifera* (Linnaeus, 1758). *Molluscan Research* 23: 101-107.
- DREYWOOD, R. 1946. Qualitative test for carbohydrate material. *Industrial and Engineering Chemistry*. (Anal. ed.), 18(8): 499.
- DUGAN, J. E. y McLACHLAN, A. 1999. An assessment of longshore movement in *Donax serra* Röding (Bivalvia: Donacidae) on an exposed sandy beach. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 234: 111-124.
- E**NRIGHT, C.T.; NEWKIRK, G.F.; CRAIGIE, J.S. y CASTELL, J.D. 1986. Evaluation of phytoplankton as diet for juvenile *Ostrea edulis* L. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 96: 1-13.
- EPIFANIO, C.E. 1976. Culture of bivalve molluscs in recirculating systems: Nutrition pp: 173-194. En: Price, K.S.; Shaw, W. & Dunberg, K. (ed.). *Proceedings 1st International Conference on Aquaculture Nutrition*. Newark, Delaware, USA.

- F**ERNÁNDEZ-OTERO, J. 1982. Aportación al estudio de la biología del bivalvo *Donax trunculus* L., en la Ría del Barquero. Tesina, Universidad de Santiago de Compostela. 92 pp.
- FERNÁNDEZ-PARDO, A. 2011. Cultivo de fitoplancton en sistema continuo. Evaluación del efecto de distintos parámetros. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Santiago de Compostela.
- FERNÁNDEZ-REIRIZ, M.J.; PÉREZ-CAMACHO, A.; FERREIRO, M.J.; BLANCO, J.; PLANAS, M.; CAMPOS, M.J. y LABARTA, U. 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (Total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture*. 83: 17-37.
- FERNÁNDEZ-REIRIZ, M.J.; LABARTA, U.; ALBENTOSA, M. y PÉREZ-CAMACHO, A. 2006. Lipid composition of *Ruditapes philippinarum* spat: Effect of ration and diet quality. *Comparative Biochemistry and Physiology*. B. 144: 229-237.
- FERNÁNDEZ-REIRIZ, M.J.; PÉREZ-CAMACHO, A.; PETEIRO, L.G. y LABARTA, U. 2009. Growth and kinetics of lipids and fatty acids of the clam *Venerupis pullastra* during larval development and postlarvae. *Aquaculture Nutrition*. 17(1): 13-23.
- FERREIRO, M.J.; PÉREZ-CAMACHO, A.; LABARTA, U.; BEIRAS, R.; PLANAS, M.; FERNÁNDEZ-REIRIZ, M.J. 1990. Changes in the biochemical composition of *Ostrea edulis* larvae fed on different food regimens. *Marine Biology* 106:395-401.
- FOLCH, J.; LEES, M. y STANLEY, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from the animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 226: 497-509.
- FRAGA, F. 1956. Determinación de glucógeno en moluscos con el reactivo de antrona. *Investigaciones Pesqueras*. III: 69-74.

- FRENKIEL, L. y MOÛEZA, M. 1979. Développement larvaire de deux Tellinacea, *Scrobicularia plana* (Semelidae) et *Donax vittatus* (Donacidae). *Marine Biology* 55: 187-195.
- G**ABBOTT, P.A. y BAYNE, B.L. 1973. Biochemical effects of temperature and nutritive stress on *Mytilus edulis* L. *Journal of the Marine Association*. U.K. 53: 269-286.
- GABBOTT, P.A. 1975. Storage cycle in marine bivalve molluscs: a hypothesis concerning the relationships between glucogen metabolism and gametogenesis. En *Proceedings of the 9th European Marine Biology Symposium*, Oban, Scotland. Aberdeen Univ. Press. 191-211.
- GABBOTT, P.A. 1983. Development and seasonal metabolic activities in marine mollusca. En: Hochachka, P.W. (ed). *The Mollusca*. Vol. 2. Environmental biochemistry and physiology. Academic Press, New York. 165-219.
- GALLAGER, S.M.; MANN, R. y SASAKI, G.C. 1986. Lipid as an index of growth and viability in three species of bivalve larvae. *Aquaculture* 56: 81-103.
- GALTSTOFF, P.S. 1930. The fecundity of the oyster. *Science*. 72: 97-98.
- GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.; DE COO-MARTÍN, A.; CERVIÑO-EIROA, A.; BAO-IGLESIAS, M. y DOMÍNGUEZ, M. 2001. Primeros resultados de crecimiento de semilla de moluscos en batea con circulación de agua por sistema forzado en la ría de Arousa. Galicia. España. *VIII Congreso Nacional de Acuicultura*: 302-303.
- GARLAND, E.D. y ZIMMER, C.A. 2002. Techniques for the identification of bivalve larvae. *Marine Ecology Progress Series*. 225: 299-310.
- GASPAR, M.B. 1996. Bivalves do litoral oceânico algarvio. Aspectos da biologia, ecologia e da pescaria dos mananciais de interesse económico: aplicação à gestão dos recursos. Tesis. Universidad do Algarve: Portugal. 282 pp.

- GASPAR, M.B.; FERREIRA, R. y MONTEIRO, C.C. 1999. Growth and reproductive cycle of *Donax trunculus* L., (Mollusca: Bivalvia) off Faro, southern Portugal. *Fisheries Research*. 41(3): 309-316.
- GASPAR, M.B.; CHÍCHARO, L.M.; VASCONCELOS, P.; GARCÍA, A.; SANTOS, A.R. y MONTEIRO, C.C. 2002. Depth segregation phenomenon in *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) populations of the Algarve coast (southern Portugal). *Scientia Marina*. 66(2): 111-121.
- GIESE, A.C. 1966. Lipids in Economy of Marine Invertebrates. *Physiological Reviews*. 46: 244-298.
- GIESE, A.C. 1967. Some methods for study of the biochemical constitution of marine invertebrates. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*. 5:159-186
- GLEMAREC, M. y BOURON, D. 1978. Evolution de la maturité sexuelle chez six espèces de bivalves des Glénan. *Haliotis*. 9(1): 45-48.
- GOFAS, S. 2015. *Donax trunculus* Linnaeus, 1758. Accessed through: World Register of Marine Species at. <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=139602>.
- GOSLING, E. 2003. Bivalve molluscs: biology, ecology and culture. Blackwell, London.
- GROVE, E.L.; JONES, R.A. y MATHEWS, W. 1961. The loss of sodium and potassium during the dry ashing of animal tissues. *Analytical Biochemistry*. 2:221-230.
- GUERRA, A. 1979. Producción de semilla de ostra y almeja en la Planta de Cultivos Marinos de Ribadeo. *Cuadernos Marisqueros*.
- GUERRA, A. 2009. Proyecto demostración de criaderos y semilleros para almeja en recintos de alta productividad. *Jornadas sobre criaderos, semilleros y cultivo de almejas*. 23-32.

- GUILLOU, J. y LE MOAL, L. 1978. Variabilité spatio-temporelle des populations de *Donax* en Baie de Douarnenez. *Haliotis*. 9: 77-88
- GUILLOU, J. y LE MOAL, L. 1980. Aspect de la dynamique des populations de *Donax vittatus* et *Donax trunculus* en Baie de Douarnenez. *Annales de L'Institut Océanographique*. Paris 56(1): 55-64.
- GUILLOU, J. 1982. Variabilité des populations de *Donax trunculus* et *Donax vittatus* en Baie de Douarnenez. *Netherlands Journal of Sea Research*. 16: 88-95.
- HAWS, M.C.; DIMICHELE, L. y HAND, S.C. 1993. Biochemical changes and mortality during metamorphosis of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 2: 207-217.
- HEALY, J.M.; MIKKELSEN, P.M. y BIELER, R. 2008. Sperm ultrastructure in *Hemidonax pictus* (Hemidonacidae, Bivalvia, Mollusca): comparison with other heterodonts, especially Cardiidae, Donacidae and Crassatelloidea. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 153: 325-347.
- HERRMANN, M.; LEPORE, M.L.; LAUDIEN, J.; ARNTZ, W.E. y PENCHASZADEH, P.E. 2009. Growth estimations of the Argentinean wedge clam *Donax hanleyanus*: A comparison between length-frequency distribution and size-increment analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 379: 8-15.
- HESS, H.H.; LEES, M.B. y DERR, J.E. 1978. A linear Lowry-Folin assay for both water-soluble and sodium dodecyl sulfate-solubilized proteins. *Analytical Biochemistry*. 85: 295-300.
- HIS, E.; MAURER, D. 1988. Shell growth and gross biochemical composition of *Crassostrea gigas* larvae in the natural environment. *Aquaculture* 69:185-194.

- HIS, E. y SEAMAN, M.N.L. 1992. Effects of temporary starvation on the survival, and on subsequent feeding and growth, of oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. *Marine Biology*. 114: 277-279.
- HODGSON, A.N.; BERNARD, R.T.F. y VAN DER HORST, G. 1989. Comparative spermatology of three species of *Donax* (Bivalvia) from South Africa. *Journal of Molluscan Studies*. 56: 257-265.
- HOLLAND, D.A. y CHEW, K.K. 1974. Reproductive cycle of the manila clam (*Venerupis japonica*), from Hood Canal, Washington. *Proceedings of the National Shellfisheries Association*. 64: 53-58.
- HOLLAND, D.L. 1978. Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates. *Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology*. 85-123.
- HOLLAND, D.L.; SPENCER, B.E. 1973. Biochemical changes in fed with and starved oysters, *Ostrea edulis* (L.) during larval development, metamorphosis and early spat growth. *Journal of the Marine Biology Association, U.K.* 53: 287-298.
- HU, Y-P.; LUTZ, R.A. y VRIJENHOEK, R.C. 1992. Electrophoretic identification and genetic analysis of bivalve larvae. *Marine Biology*. 113: 227-230.
- ISHAM, L.B. y TIERNEY, J.Q. 1953. Some Aspects of the Larval Development and Metamorphosis of *Teredo* (*Lyrodus*) *Pedicellata* De Quatrefages. *Bulletin of Marine Science*. 2(4): 574-589.
- JARA-JARA, R. 1995. Crecimiento de semilla de *Venerupis pullastra* M. y de *Ruditapes decussatus* L. en agua residual procedente de cultivo de rodaballo (*Psetta maxima* L.). Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- JEFFRIES, V.E. 1982. Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Aquaculture* 29: 201-226.

- KNAUER, J. y SOUTHGATE, P.C. 1997. Growth and fatty acid composition of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat fed a spray-dried freshwater microalga (*Spongiococcum excentricum*) and microencapsulated lipids. *Aquaculture*. 154(3-4): 293-303.
- KNAUER, J. y SOUTHGATE, P. C. 1999. A review of the nutritional requirements of bivalves and the development of alternative and artificial diets for bivalve aquaculture. *Reviews in Fisheries Science*. 7: 241-280.
- KNIPRATH, E. 1980. Larval development of the shell and shell gland in *Mytilus* (Bivalvia). *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology*. 188: 201-204.
- LA VALLE, P. 2005. *Donax trunculus* (Bivalvia:Donacidae) quale indicatore biologico degli equilibri costieri e del bilancio sedimentario. Tesis doctoral. Università degli Studi di Roma "La Sapienza". 148 pp.
- LABARTA, U.; FERNÁNDEZ-REIRIZ, M.J. y PÉREZ-CAMACHO, A. 1999. Larvae of *Ostrea edulis* (L.) during starvation: growth, energy and biochemical substrates. *Hidrobiología*. 405: 125-131.
- LAUDIEN, J; BREY, T.; ARNTZ, W.E. 2003. Population structure, growth and production of the surf clam *Donax serra* (Bivalvia, Donacidae) on two Namibian sandy beaches. *Coastal and Shelf Science* 58S. 105–115.
- LE PENNEC, M. 1970. Elevages au laboratoire de Mollusque bivalves: morphogénèse de la coquille des *Veneridae*. Tesis 3^{er} ciclo. Paris, Francia.
- LOOSANOFF, V. 1954. New advances in the study of bivalve larvae. *American Science*. 42: 607-624.
- LOOSANOFF, V. y DAVIES, H.C. 1963. Rearing of bivalve larvae. *Adv. Marine Biology*. 1: 1-136.
- LOOSANOFF, V.; DAVIES, H.C. y CHANLEY, P.E. 1966. Dimensions and shapes of larvae of some marine bivalve mollusks. *Malacologia*. 4: 351-435.

- LORENZO, S.; FUENTES, J. y GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A. 2003. Identification of *Mytilus galloprovincialis* larvae from the Galician Rías by mouse monoclonal antibodies. *Aquaculture*. 219: 545-559.
- LOUZÁN, A.; CERVIÑO-OTERO, A.; NÓVOA, S.; OJEA, J. y MARTÍNEZ, D. 2008. Seguimiento del ciclo reproductor y desarrollo larvario de una población de coquina, *Donax trunculus* (Linné, 1758). *X Foro dos recursos mariños e da acuicultura das rías galegas e I foro iberoamericano dos recursos mariños e da acuicultura*. 475-480.
- LOUZAN-PÉREZ, A. 2008. Ciclo reproductor, composición bioquímica y patología de los progenitores de *Donax trunculus* (Linné, 1758), de un banco natural de Valdoviño (NO Galicia), para la obtención de semilla en criadero. Diploma de Estudios Avanzados. Universidad de Santiago de Compostela: 67 pp.
- LOUZÁN, A.; DA COSTA, F.; NÓVOA, S.; OJEA, J. y MARTÍNEZ-PATÍÑO, D. 2009. Estudio del desarrollo larvario de una población de coquina *Donax trunculus* (Linné, 1758). *XII Congreso Nacional de Acuicultura*: 572-573.
- LOUZÁN, A.; NÓVOA, S.; OJEA, J. y MARTÍNEZ-PATÍÑO, D. 2010. Adaptación de semilla de coquina *Donax trunculus* (Linné, 1758) al medio natural. *XII Foro dos recursos mariños e da acuicultura das rías galegas e I foro iberoamericano dos recursos mariños e da acuicultura*: 211-215.
- LOUZÁN, A.; FERNÁNDEZ-PARDO, A.; NÓVOA, S.; OJEA, J. y MARTÍNEZ-PATÍÑO, D. 2011a. Efecto de la temperatura en el acondicionamiento de coquina *Donax trunculus* (Linné, 1758) en criadero. *XIII Congreso Nacional de Acuicultura*. P-142.
- LOUZÁN, A.; DA COSTA, F.; NÓVOA, S.; OJEA, J. y MARTÍNEZ-PATÍÑO, D. 2011b. Efecto de dos tipos de dietas en el desarrollo larvario de la coquina *Donax trunculus* (Linné, 1758). *XIII Foro dos recursos mariños e da acuicultura das rías galegas*. 13: 301-307.
- LOWRY, H.O.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. y RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin fenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.

- LU, Y.T.; BLAKE, N.J. y TORRES, J.J. 1999. Biochemical utilization during embryogenesis and metamorphosis in the Bay Scallop, *Argopecten irradians concentricus* (Say). *Journal of Shellfish Research*. 18(2): 425-429.
- LUBET, P. 1959. Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les *Mytilidae* et les *Pectinidae* (Moll. Bivalves). *Revue Trav. Inst (scient. tech). Pêche Maritime*. 23: 387-548.
- LUBET, P. 1996. Bases biológicas del cultivo de moluscos. En: *Bases biológicas y ecológicas de la acuicultura*. G. Barnabé (coordinador). Ed. Acribia. Zaragoza. España. 100-216.
- LUCAS, A. 1965. Recherche sur la sexualité des mollusques bivalves. Thèse sci. Université Rennes. 140 pp.
- LUCAS, A.; CHEBAB-CHALABI, L. y ALDANA-ARANDA, D. 1986. Pasaje de l'endotrophie à l'exotrophie chez les larves de *Mytilus edulis*. *Oceanology. Acta*. 9: 97-103.
- MANN, R. 1979. Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* sustained at elevated temperatures *Journal of the Marine Association*. U.K. 59: 95-110.
- MARGARETE-RAMOS, A.; PEREIRA, A.; JOAQUIM, S. y MATIAS, D. 2010. Physiological recovery from prolonged starvation in larvae of *Donax trunculus*. *Aquaculture Europe* 10: 795-796.
- MÁRQUEZ, L.; RUIZ-AZCONA, P. y MORENO, O. 2009. Crecimiento y supervivencia de larvas de *Donax trunculus* (Mollusca: Bivalvia) cultivadas a distintas temperaturas. *XII Congreso Nacional de Acuicultura*: 174-175.
- MARSH, A.G.; MULLINEAUX, L.; YOUNG, C. y MANAHAN, D. 2001. Larval dispersal potential of the tubeworm *Riftia pachyptila* at deep-sea hydrothermal vents. *Nature* 411: 77-80.

- MARSH, J.B. y WEINSTEIN, D.B. 1966. Simple carrying method for determination of lipids. *Journal of Lipid Research*. 7: 574-576.
- MARSHALL, R.; McKINLEY, S. y PEARCE, C.M. 2010. Effects of nutrition on larval growth and survival in bivalves. *Aquaculture*. 2: 33-55.
- MARTÍNEZ, D.; RODRÍGUEZ-MOSCOSO, M.E.; ARNAIZ, R.; ALONSO de LANDA, J.L. y CAMIÑO, J.M. 1993. Ciclo reproductor de la coquina, *Donax trunculus*, relaciones con su contenido en proteínas, glucógeno, lípidos y ácidos grasos poliinsaturados. *Libro de Actas del IV Congreso Nacional de Acuicultura*. 347-352.
- MARTÍNEZ, D.; NÓVOA, S. y OJEA, J. 2001. Cultivo larvario y postlarvario de almeja fina (*Ruditapes decussatus*) y almeja babosa (*Venerupis senegalensis*) en criadero. *Actas de VIII Congreso Nacional de Acuicultura*. Santander. 304-306.
- MARTÍNEZ, D.; OJEA, J.; NÓVOA, S. y RODRÍGUEZ, J.L. 2002. The relation between the oocyte quality of four species of bivalve molluscs and their rates of larval growth. *Abstracts Aquaculture Europe 2002*. Special publication nº 32. 333-334.
- MARTÍNEZ-PATIÑO, D. 2002. Estudio de los solénidos, *Solen marginatus* (Pennant, 1777) y *Ensis siliqua* (Linné, 1758), de los bancos naturales de la Ría de Ortigueira y Ría del Barquero: ciclo gametogénico, composición bioquímica y cultivo larvario. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. 240 pp.
- MARTÍNEZ-PATIÑO, D.; NÓVOA-VÁZQUEZ, S.; OJEA-MARTÍNEZ, J.; y RODRÍGUEZ-MOSCOSO, E. 2003. Determinación de la talla de primera maduración sexual de la coquina, *Donax trunculus* (Linné, 1758) (Mollusca: Bivalvia), en un banco natural de la Ría del Barquero (NO Galicia). *Libro de Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura*. 215-217.
- MARTÍNEZ-PATIÑO, D. y DA COSTA. 2008. Cultivo de navaja, longueirón y longueirón vello. In: Navajas y longueirones: biología, pesquerías y cultivo

- (ed. by A. Guerra y C. Lodeiros). Xunta de Galicia. Consellería de Pesca eAsuntos Marítimos, Santiago de Compostela, Spain: 187-211.
- MARTÍNEZ-PATIÑO, D.; CERVIÑO-OTERO, A.; LOUZÁN, A.; DA COSTA, F.; OJEA, J. y NÓVOA, S. 2008. Producción de especies de interés marisquero en la Planta de Cultivos de Ribadeo. *II Foro Iberoamericano de los Recursos Marinos y la Acuicultura*. Cumaná. Venezuela. 629-633.
- MARTÍNEZ-PATIÑO, D.; CERVIÑO-OTERO, A.; ARANDA, J.A.; MONTES, J. y OJEA, J. 2011. Primeros resultados del proyecto: desarrollo del cultivo en criadero de la almeja rubia *Venerupis rhomboides*. *XIII Foro dos recursos mariños e da acuicultura das rías galegas*. 13: 435-441.
- MARTÍNEZ-PATIÑO, D. 2013. Balance de las nuevas especies aportadas a la diversificación de la acuicultura y el marisqueo. *XV Foro dos recursos mariños e da acuicultura das rías galegas*. 15: 95-115.
- MARTÍNEZ, G.; AGUILERA, C. y METTIFOGO, L. 2000. Interactive effects of diet and temperature on reproductive conditioning of *Argopecten purpuratus* broodstock. *Aquaculture*.183: 149-159.
- MARTÍNEZ, G. Y PÉREZ, H. 2003. Effect of different temperature regimes on reproductive conditioning in the scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquaculture* 228 (1-4): 153-167.
- MARTÍNEZ, M.; CERVIÑO, A.; COO, A.; GARCÍA, A.; MARTÍNEZ PATIÑO, D.; NÓVOA, S.; OJEA, J.; SEBE, M.P.; CASAL, A.; FARIÑA, J.; MOSQUERA, P. y RODRÍGUEZ, R. 1997. Parámetros biológicos y medioambientales del preengorde de almeja fina (*Venerupis decussata*) en sistemas sobreelevados. *Xornadas sobre o Desenvolvemento Produtivo do Marisqueo a Pé*. Santiago de Compostela.
- MARTÍNEZ-PITA, I.; SÁNCHEZ-LAZO, C.; RUÍZ-JARABO, I.; HERRERA, M.; MANCERA, J.M. 2012. Biochemical composition, lipid classes, fatty acids and sexual hormones in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from cultivated populations in south Spain. *Aquaculture* 358-359: 274-283.

- MATIAS, D.; JOAQUIM, S.; LEITAO, A. y MASSAPINA, C. 2008. Effect of geographic origin, temperature and timing of Broodstock collection on conditioning, spawning success and larval viability of *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758). *Aquaculture International*. 17(3): 257-271.
- MATIAS, D.; JOAQUIM, S.; RAMOS, M.; SOBRAL, P. y LEITAO, A. 2011. Biochemical compounds dynamics during larval development of the carpet-shell clam *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758): effects of mono-specific diets and starvation. *Helgoland Marine Research*. 65: 369-379.
- MAZÉ, R.A. y LABORDA, A.J. 1990. Cambios estacionales de una población de *Donax trunculus* L. en la Ría del Barquero (Lugo, NO España). *Scientia Marina*. 54: 131-138.
- MORAN, A.L. y MANAHAN, D.T. 2004. Physiological recovery from prolonged “starvation” in larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 306(1): 17-36.
- MOROWITZ, H.J. 1968. Energy flow in biology. Academic Press, London. 179 pp.
- MORVAN, C. y ANSELL, A.D. 1988. Stereological methods applied to reproductive cycle of *Tapes rhomboides*. *Marine Biology*. 97: 355-364.
- MOUËZA, M. y FRENKIEL-RENAULT, L. 1973. Contribution à l'étude de la biologie de *Donax trunculus* L. (Mollusques Lamellibranches) dans L'Algérois: la reproduction. *Cahiers de Biologie Marine*. 14: 261-283.
- MOUËZA, M. 1975. Contribution à l'étude de la biologie de *Donax trunculus* L. Mollusque Lamellibranche dans l'Algérois. Thèse Doct. Es. Sciences Nat., Univ. Aix-Marseille, 196 pp.
- MOUËZA, M. 1976. Contribution à l'étude de la biologie de *Donax trunculus* L. (Mollusque Lamellibranche) mecanisme de la nutrition. *Journal of Molluscan Studies*. 42: 17-30.
- MOUËZA, M y FRENKIEL, L. 1978. Le système circulatoire et le jeu des siphons chez *Donax trunculus*, Mollusque Lamellibranche. *Malacología*. 17(1): 117-124.

MOUËZA, M.; GROS, O. y FRENKIEL, L. 2006. Embryonic development and Shell differentiation in *Chione cancellata* (Bivalvia: Veneridae): an ultrastructural analysis. *Invertebrate Biology*. 125: 21-33.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 1993. Nutrient requirements of fish. National Academy Press. Washington DC.

NÓVOA, S. 2007. Metabolismo lipídico, ácidos grasos en el cultivo larvario de almeja babosa, *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803). “Calidad ovocitaria, larvaria y nutricional con una aproximación al uso de la microencapsulación lipídica”. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. 244 pp.

OJEA, J. 2013. Estudio del desarrollo gametogénico de la almeja fina, *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758) en el medio natural y optimización de las condiciones del acondicionamiento en criadero. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela: 155 pp.

OJEA, J.; MARTÍNEZ-PATIÑO, D. y NÓVOA, S. 2001 Ciclo gametogénico de una población de almeja fina (*Ruditapes decussatus*) y relación con su contenido en glucógeno. *Actas VIII Congreso Nacional de Acuicultura*. 309-311.

OJEA, J.; MARTÍNEZ, D.; NÓVOA, S.; PAZOS, J. y ABAD, M. 2002. Contenido y distribución de glucógeno en relación con el ciclo gametogénico de *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758) en una población natural de las lagunas de Baldaio (Galicia, noroeste de España). *Boletín del Instituto Español de Oceanografía*. 18(1-4): 307-313.

OJEA, J.; PAZOS, J.; MARTÍNEZ, D.; NÓVOA, S.; SÁNCHEZ, J.L. y ABAD, M. 2004. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussatus* in relation to the gametogenic cycle. *Aquaculture* 238: 451-468.

- OJEA, J.; MARTÍNEZ, D.; NÓVOA, S.; CERVIÑO-OTERO, A. 2005. Ciclo gametogénico de una población de almeja japonesa *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) en la Ría de Camariñas (Noroeste de España) y relación con la composición bioquímica mayoritaria. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía*. 21(1-4): 337-342.
- OJEA, J.; SILVA, A.; MARTÍNEZ, D.; NÓVOA, S.; GARCÍA-MARTÍNEZ, P. y ABAD, M. 2007. Condiciones óptimas para el acondicionamiento de la almeja fina, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758) en criadero. *Actas del XI Congreso Nacional de Acuicultura*. Vigo, Pontevedra. 391-394.
- OJEA, J.; PAZOS, A.J.; MARTÍNEZ, D.; NÓVOA, S.; GARCÍA-MARTÍNEZ, P.; SÁNCHEZ, J.L. y ABAD, M. 2008. Effects of temperature regime on broodstock conditioning of *Ruditapes decussatus*. *Journal of Shellfish Research*. 27(5):1093-1100.
- ORTÍZ, E.; URÍA, E.; SILVA-OLIVARES, A.; TSUTSUMI, V. y SHIBAYAMA, M. 2003. Estudio de la ultraestructura de la espermatogénesis de *Anadara tuberculosa* (Sowerbi, 1833) (Mollusca: Pelecipoda: Arcidae). *Hidrobiológica*. 13(2): 145-150.
- P**ASCUAL, M.S. y ZAMPATTI, E.A. 1995. Evidence of a chemically mediated adult-larval interaction triggering settlement in *Ostrea puelchana*: applications in hatchery production. *Aquaculture* 133(1): 33-44.
- PAUGAM, A.; LE PENNEC, M. y GENEVIÈVE, A.F. 2000. Immunological recognition of marine bivalve larvae from plankton samples. *Journal of Shellfish Research*. 19: 325-331.
- PÉREZ-CAMACHO, A.; ROMÁN-CABELLO, G. y TORRE-CERVIGÓN, M. 1977. Experiencias en cultivos de larvas de tres especies de moluscos bivalvos: *Venerupis pullastra* (Montagu), *Venerupis decussata* (Linnaeus) y *Ostrea edulis* (Linnaeus). *Boletín del Instituto Español de Oceanografía*. 235: 215-268.

- PERNET, F.; TREMBLAY, R. 2004. Effect of varying levels of dietary essential fatty acid during early ontogeny of the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 310:73-86.
- PETTERSEN, A.K.; TURCHINI, G.M.; JAHANGARD, S.; INGRAM, B.A. y SHERMAN, C.G.H. 2010. Effects of different dietary microalgae on survival, growth, settlement and fatty acid composition of blue mussel (*Mytilus galloprovincialis*) larvae. *Aquaculture*. 309: 115-124.
- PONIS, E.; PARISI, G.; LE COZ, J.R.; ROBERT, R.; ZITTELLI, G.C. y TREDICI, M.R. 2006. Effect of the culture system and culture technique on biochemical characteristics of *Pavlova lutheri* and its nutritional value for *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture nutrition*. 12: 322-329.
- PRADO, S.; LOUZÁN, A.; Balsa, S.; DUBERT, J.; NÓVOA, S.; MONTES, J. y BARJA, J. 2009. Estudio de la evolución de la carga bacteriana asociada a reproductores de coquina (*Donax trunculus*) durante el acondicionamiento en criadero. *XII Congreso Nacional de Acuicultura*: 284-285.
- QUAYLE, D.B. 1952. Structure and biology of the larva and spat of *Venerupis pullastra* (Montagu). *Transactions of the Royal Society*. Edinburgh. 62: 255-297.
- RALEIGH, J. y KEEGAN, B.F. 2007. Embryonic development in the bivalve *Scrobicularia plana* (Semelidae) using scanning electron microscopy. *Invertebrate Reproduction and Development*. 50: 139-144.
- RICO-VILLA, B.; LE COZ, J.R.; MINGANT, C. y ROBERT, R. 2006. Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*. 256: 377-388.

- RICO-VILLA, B.; POUVREAU, S. y ROBERT, R. 2009. Influence of food density and temperature on ingestion, growth and settlement of Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 287: 395-401.
- ROBERT, R.; TRUT, G. y LABORDE, J.L. 1993. Growth, reproduction and gross biochemical composition of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in the bay of Arcachon. France. *Marine Biology*. 116: 291-299.
- ROBINSON, A. 1992. Gonadal cycle of *Crassostrea gigas* Kumamoto (Thunberg) in Yaquina Bay, Oregon and optimum conditions for Broodstock oysters and larval culture. *Aquaculture*. 106(1): 89-97.
- RODRÍGUEZ-MOSCOSO, E. 2000. Histofisiología de la reproducción de almeja fina *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758) en la Ría de Arousa (población natural y población de cultivo). Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. 202 pp.
- RODRÍGUEZ, J.L.; SEDANO, F.J.; GARCÍA-MARTÍN, L.O.; PÉREZ-CAMACHO, A.; SÁNCHEZ, J.L. 1990. Energy metabolism of newly settled *Ostrea edulis* spat during metamorphosis. *Marine Biology*. 106: 109-111.
- RODRÍGUEZ-MOSCOSO, E.; ARNAIZ, R.; COO, A.; MARTÍNEZ-PATIÑO, D.; SILVA, A. y VARELA, J.A. 1993. Proceso de maduración y acondicionamiento de *Tapes decussatus* (Linné, 1787) fuera de la época natural. *Actas IV Congreso Nacional de Acuicultura*. 335-340.
- RODRÍGUEZ-MOSCOSO, E. y ARNAIZ, R. 1998. Gametogenesis and energy storage in a population of the grooved carpet-shell clam, *Tapes decussatus* (Linné, 1787), in northwest Spain. *Aquaculture*. 162: 125-139.
- RUIZ, C. 1992. Composición bioquímica y ciclo reproductor en *Ostrea edulis* L., y *Crassostrea gigas* Th. Tesis Doctoral. Univ. de Santiago de Compostela.
- RUIZ-AZCONA, P.; RODRÍGUEZ-SIERRA, R. y MARTÍN, J.B. 1996. Culture of coquina clam, *Donax trunculus*, larvae. *Aquaculture*. 139: 151-155.

- SALAS, C. 1987. Ecología de los Donacidae (Mollusca: Bivalvia) de la bahía de Málaga (SE de España). *Investigaciones Pesqueras*. 51(1): 67-77.
- SÁNCHEZ-LAZO, C. y MARTÍNEZ-PITA., I. 2012. Biochemical and energy dynamics during larval development of the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). *Aquaculture*. 358-359: 71-78.
- SASTRY, A.N. 1965. The development and external morphology of pelagic larval and post-larval stages of the Bay Scallop *Aequipecten irradians concentricus* Say, reared in the laboratory. *Bulletin of Marine Science*. 15(2): 417-435.
- SASTRY, A.N. 1979. Pelecypoda (excluding Ostreidae). En: *Reproduction of Marine Invertebrates*, Vol. 5. Molluscs. Pelecypods and Lesser Classes Giese A. C. y Pearse J. S, eds., 113-292. Academic Press, New York.
- SHILLING, F. y MANAHAN, D.T. 1994. Energy metabolism and amino acid transport during early development of Antarctic and temperate echinoderms. *Biological Bulletin*. 187: 398-407.
- SOKAL, R.R. y ROHLF, F.J. 1995. Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. Third edition. Freeman, Nueva York, USA. 358 pp.
- SOUDANT, P. 1995. Les phospholipides et les sterols des geniteurs et des larves de coquille Saint Jacques *Pecten maximus* (L.). Relations avec la nutrition. Thèse de doctoral. Univ. de Brest. 277 pp.
- SOUDANT, P.; MARTY, Y.; MOAL, J.; ROBERT, R.; QUÉRÉ, C.; LE COZ, J.R. y SAMAIN, J.F. 1996. Effect of food fatty acid and sterol quality on *Pecten maximus* gonad composition and reproduction process. *Aquaculture*. 143(3-4): 361-378.
- SOUDANT, P.; DELAPORTE, M.; MOAL, J.; KRAFFE, E.; MARTY, Y. y SAMAIN, J.F. 2005. Incorporation and modification of dietary fatty acids in gill polar lipids by two bivalve species *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 140(4): 460-470.

- T**ANG, B.; LIU, B.; WANG, G.; ZHANG, T. y XIANG, J. 2006. Effects of various algal diets and starvation on larval growth and survival of *Meretrix meretrix*. *Aquaculture*. 254: 526-533.
- THORSON, G. 1946. Reproduction and larval development of Danish marine bottom invertebrates, with special reference to planktonic larvae in the Sound. (Øresund)". *Meddelelser fra Kommissionen for Danmarks Fiskeri- og Havundersøgelser. Serie Plankton* 4 (1): 1-523.
- TLILI, S.; METAIS, I.; AYACHE, N.; BOUSSETTA, H.; MOUNEYRAC, C. 2011. Is the reproduction of *Donax trunculus* affected by their sites of origin contrasted by their level of contamination?. *Chemosphere* 84(10): 1362-1370.
- TIWARI, S. y GALLAGER, S. 2003. Machine learning and multiscale methods in the identification of bivalve larvae. Proceedings of the Ninth IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV 2003) 2-Volume set 0-7695-1950-4/03 © 2003 IEEE.
- TORO, J.E. 1998. Molecular identification of four species of mussels from southern Chile by PCR-based molecular markers: the potential use in studies involving planktonic surveys. *Journal of Shellfish Research*. 17: 1203-1205.
- TURNER, H.J. y GEORGE, C.J. 1955. Some aspects of the behavior of the quahog, *Venus mercenaria*, during the early stages. Mass. Dep. Nat. Resour., Div. Mar. Fish. *Investigation of Shellfish Mass Reproduction*. 8: 5-14.
- U**RIARTE, I.; FARÍAS, A.; HERNÁNDEZ, J.; SCHÄFER, C.; SORGELOOS, P. 2004. Reproductive conditioning of Chilean scallop (*Argopecten purpuratus*) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): effects of enriched diets. *Aquaculture* 230: 349-357.
- UTTING, S.D. 1986. A preliminary study on growth of *Crassostrea gigas* larvae and spat in relation to dietary protein. *Aquaculture* 56: 123-138.

- VERDONK, N.H. y VAN DEN BIGGELAAR, J.A.M. 1983. Early development and the formation of germ layers. En: *The Mollusca, Development*. 3: 91-134.
- VILLEGAS, M.L.; FARIÑAS, P.; FERNÁNDEZ, A. y GONZÁLEZ, A. 2001. Crecimiento y supervivencia en el cultivo de almeja fina (*Ruditapes decussatus*) y almeja japonesa (*R. philippinarum*) sembradas en parques y en cajas en la Ría del Eo (Asturias N. de España). *VIII Congreso Nacional de Acuicultura*: 328-329.
- WALNE, P.R. 1966. Experiments in the large-scale culture of the larvae *Ostrea edulis* L. *Fisheries Investigation. Ministry of Agriculture Fisheries and Food* (UK). Ser 2. 25.
- WASSNIG, M. y SOUTHGATE, P.C. 2011. Embryonic and larval development of *Ptereria penguin* (Röding, 1798) (Bivalvia: Pteriidae). *Journal of Molluscan Studies*. 0: 1-8.
- WEBB, K.L. y CHU, F.L. 1982. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. 272-291. En: Pruder, G.; Langdon, C.J. y Conklin, D.E. (ed). *Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition*, 2. Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana, USA.
- WHYTE, J.N.C.; BOURNE, N.; GINTHER, N.G. 1991. Depletion of nutrient reserves during embryogenesis in the scallop *Patinopecten yessoensis* (Jay). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 149: 67-79.
- WHYTE, J.N.C.; BOURNE, N.; HODGSON, C.A. 1989. Influence of algal diets on biochemical composition and energy reserves in *Patinopecten yessoensis* (Jay) larvae. *Aquaculture* 79: 333-347.
- WILSON, D.P. 1960. Some problems in larval ecology related to the localized distribution of bottom animals. In "Perspectives in Marine Biology" (A. A. Buzzati-Traverso, ed.). University of California Press, Berkeley: 87-103.

WILSON, J. y SEED, R. 1974. Reproduction in *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Bivalvia) in Carlingford Lough, Northern Ireland. *Irish Fisheries Investigations* B. 15: 1-30.

WINBERG, G.G. 1971. Methods for the estimation of production of aquatic animals. *Academic Press*, London.

XIE, Q. y BURNELL, G.M. 1994. A comparative study of the gametogenic cycles of the clams *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) and *Tapes decussatus* (Linnaeus) on the south coast of Ireland. *Journal of Shellfish Research*. 13(2): 467-472.

ZHAN, G.; y YAN, X. 2006. A new three-phase culture method for Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, farming in northern China. *Aquaculture*. 258, 452-461.